

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

Metin KOÇAK

***Cyclamen coum*'da SOMATİK EMBRİYOGENESİS YÖNTEMİ
İLE REJENERASYONUN ARAŞTIRILMASI**

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA-2019

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Cyclamen coum*'da SOMATİK EMBRİYOGENESİS YÖNTEMİ İLE
REJENERASYONUN ARAŞTIRILMASI**

Metin KOÇAK

DOKTORA TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu Tez 25/10/2019 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....
Prof. Dr. N. Yeşim YALÇIN MENDİ
DANIŞMAN

.....
Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR
ÜYE

.....
Prof. Dr. Selim ÇETİNER
ÜYE

.....
Doç. Dr. Mehtap YILDIZ
ÜYE

.....
Doç. Dr. İlknur SOLMAZ
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Biyoteknoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

**Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü**

Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.

Proje No:

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

DOKTORA TEZİ

***Cyclamen coum*'da SOMATİK EMBRİYOGENESİS YÖNTEMİ İLE REJENERASYONUN ARAŞTIRILMASI**

Metin KOÇAK

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

Danışman : Prof. Dr. N. Yeşim YALÇIN MENDİ
YIL: 2019, Sayfa: 123
JÜRİ : Prof. Dr. N. Yeşim YALÇIN MENDİ
: Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR
: Prof. Dr. Selim ÇETİNER
: Doç. Dr. Mehtap YILDIZ
: Doç. Dr. İlknur SOLMAZ

Bu tez çalışmasında *C. coum* türünde, yaprak ve yaprak sapı eksplantları kullanılarak somatik embriyogenesis yöntemi ile rejenerasyon araştırılmıştır. Embriyojenik kallusların elde edilmesi için farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarda NAA, 2,4-D, BA, Kinetin ve 2-iP içeren altı farklı protokol denenmiştir. Tüm denemelerde kallus oluşumu gözlenmiştir. Ancak embriyo oluşumu, NAA, BA ve Kinetin içeren ortamlarda görülürken 2,4-D ve 2-iP içeren ortamlarda görülmemiştir. En yüksek rejenerasyon oranları *in vitro*'da muhafaza edilen bitkiciklerden alınan eksplantlar ile kurulan denemeden elde edilmiştir. Bu denemede kallus oluşum oranları, yaprak sapında %84.21 ile %91.22 arasında değişim gösterirken, yaprak eksplantlarında, %87.17 ile %89.74 arasında değişmiştir. Embriyo oluşum oranları yaprak sapı eksplantlarında %47.36 ile %68.42 arasında ve yaprak eksplantlarında %43.58 ile %69.23 arasında değişim göstermiştir. Elde edilen somatik embriyoların farklı gelişim aşamaları taramalı elektron mikroskopu ile görüntülenmiştir ve aşamalara ait farklılıklar incelenmiştir. Çalışmada somatik embriyogenesis dışında sınırlı oranda organogenesis ile rejenerasyon oluşumu da gözlenmiştir. Somatik embriyogenesis yöntemi kullanılarak elde edilen bitkicikler başarılı bir şekilde dış ortama aktarılmıştır ve aktarılan bitkilerin %82.5'i hayatta kalmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Cyclamen coum*, *in vitro*, somatik embriyogenesis

ABSTRACT

PhD THESIS

INVESTIGATIONS of REGENERATION by SOMATIC EMBRYOGENESIS METHOD in *Cyclamen coum*

Metin KOÇAK

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Supervisor : Prof. Dr. N. Yeşim YALÇIN MENDİ
Year: 2019, Page: 123
Jury : Prof. Dr. N. Yeşim YALÇIN MENDİ
: Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR
: Prof. Dr. Selim ÇETİNER
: Assoc. Prof. Dr. Mehtap YILDIZ
: Assoc. Prof. Dr. İlknur SOLMAZ

In this thesis study, regeneration by somatic embryogenesis in *C. coum* was investigated using leaf and petiole explants. Various medium containing different combinations and concentrations of NAA, 2,4-D, BA, Kinetin and 2-iP were established to obtain embryogenic callus. Callus formations were observed in all experiments. Although, embryo formation was observed in medium containing NAA, BA and Kinetin, no embryo formation was observed in medium containing 2,4-D and 2-iP. The highest regeneration rates were obtained in the cultures which were established with explants from *in vitro* derived plantlets. In this experiment, callus formation rates were ranged from 84.21% to 91.22% in petiole explants and ranged from 87.17% to 89.74% in leaf explants. Embryo formation rates were ranged from 47.36% to 68.42% in petiole explants and ranged from 43.58% to 69.23% in leaf explants. Different stages of somatic embryos were monitorized by scanning electron microscope and differences of stages were investigated. In the study, also limited regenerations via organogenesis were observed. Plantlets obtained by somatic embryogenesis method were acclimatized successfully and 82.5% of acclimatized plants survived.

Key Words: *Cyclamen coum*, *in vitro*, somatic embryogenesis

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Türkiye farklı iklimsel özellikler gösteren oldukça farklı topografik yapılara sahip olması ve 3 farklı gen kuşağında (Avrupa-Sibirya, Akdeniz ve İran-Turan) yer alması nedeni ile oldukça geniş bir biyolojik çeşitliliğe sahiptir. Endemik bitkiler biyolojik çeşitliliğimizi oluşturan en önemli kaynaklar arasında yer almaktadır. Ülkemizde doğal olarak yayılış gösteren bitkilerin yaklaşık üçte biri endemik bitkilerden oluşmaktadır.

Ülkemiz süs bitkisi ve tıbbi aromatik olarak değerlendirilen ve geofit olarak bilinen bitkiler açısından da oldukça zengindir. Ülkemizde doğal olarak yetişen ve ticari olarak önemli bir hacme sahip olan geofitlerden biri sıklamen türleridir. Türkiye’de 10 farklı sıklamen türü (*C. persicum*, *C. pseudibericum*, *C. coum*, *C. parviflorum*, *C. inteminatum*, *C. trocopteranthum*, *C. hederifolium*, *C. cilicium*, *C. mirabile*, *C. graecum*) doğal olarak yetişmektedir ve bunlardan 6 tanesi (*C. cilicium*, *C. pseudibericum*, *C. inteminatum*, *C. trocopteranthum*, *C. mirabile*, *C. parviflorum*) ülkemize endemiktir.

Ülkemizde farklı bölgelerde doğal olarak yayılış gösteren *C. coum* türü, soğuğa tolerans göstermesi nedeni ile ön plana çıkmaktadır ve soğuk iklimlere sahip Avrupa ülkeleri tarafından talep edilmektedir. Ancak bu türde geliştirilmiş bir çeşit bulunmamakta ve üretimi yapılmamaktadır. Sıklamen türlerinin klasik vejetatif yöntemler ile çoğaltımında görülen sorunlar biyoteknolojik yöntemleri önemli bir seçenek olarak karşımıza çıkarmaktadır. Biyoteknolojik yöntemler arasında somatik embriyogenesis sıklıkla kullanılan bir yöntemdir ve birçok süs bitkisi türünde başarılı bir şekilde uygulanmıştır.

Somatik embriyogenesisin en önemli kullanım alanlarından bir tanesi sentetik tohum üretimidir. Sentetik tohumlar bitkisel materyalin çoğaltımı ve muhafaza edilmesi için kullanılan biyoteknolojik bir yöntemdir. Literatürde şu ana dek *C. coum* türünde somatik embriyogenesis çalışması sınırlıdır ve sentetik tohum bildiren çalışma bulunmamaktadır.

Bu tez çalışmasında *C. coum* türünde somatik embriyogenesis yöntemi kullanılarak rejenerasyon sağlanmış ve elde edilen somatik embriyolar aljinat kapsülleri ile kaplanarak sentetik tohumlar üretilmiştir.

Somatik embriyoların üretilmesi için yaprak ve yaprak sapı eksplantları kullanılarak farklı denemeler kurulmuştur. Bu denemelerde farklı bitki büyüme düzenleyicileri (2,4-D, NAA, 2-iP, BA ve kinetin) ve MS besiyeri kullanılmıştır. Kullanılan BBD'lerden oksin olarak 2,4-D içeren ortamlardan kalluslar elde edilmesine karşın somatik embriyo üretimi sağlanamamıştır. Farklı NAA, BA ve kinetin içeren ortamlarla kurulan denemede ise 8 farklı ortamdan (1 mg/l NAA + 2 mg/l BA, 2 mg/l NAA + 1.5 mg/l BA, 2 mg/l NAA + 2 mg/l BA, 2.5 mg/l NAA + 0.5 mg/l BA, 2.5 mg/l NAA + 1 mg/l BA, 2.5 mg/l NAA + 1.5 mg/l BA, 2 mg/l NAA + 1 mg/l Kinetin ve 2 mg/l NAA + 2 mg/l Kinetin) somatik embriyo üretimi gerçekleşmiştir.

In vitro koşullarda elde edilen bitkilerden alınan yaprak ve yaprak sapı eksplantları 4 farklı besi ortamında (2 mg/l NAA + 1 mg/l BA, 2 mg/l NAA + 2 mg/l BA, 2 mg/l NAA + 1 mg/l Kinetin, 2 mg/l NAA + 2 mg/l Kinetin) kültüre alınmıştır. Bu ortamlardan yaprak sapı eksplantından %84.21 ile %91.22 oranında kallus oluşumu görülürken, yaprak eksplantından %87.17 ile %89.74 oranında kallus elde edilmiştir. Somatik embriyo oluşumu yaprak sapında %47.36 ile %68.42 arasında değişim göstermiştir. Yaprak eksplantından somatik embriyo oluşumu ise %43.58 ile %69.23 arasında değişim göstermiştir.

Elde edilen somatik embriyoların gelişim aşamaları stereo mikroskop ve taramalı elektron mikroskopu ile görüntülenmiş ve incelenmiştir. Gelişim aşamalarındaki doku yüzeylerinde görülen farklı yapılaşmalar tespit edilmiştir.

Somatik embriyolar BBD içermeyen ortamlarda çimlenerek bitkiciklere dönüştürülmüştür. Bitkicikler başarılı bir şekilde dış ortama aktarılmıştır ve aktarılan bitkiciklerin %82.5'i hayatta kalmıştır.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimin başından itibaren bilimsel açıdan her türlü imkan ve olanakları sağlayan, karşılaştığım bütün zorluklarda yol gösteren fikir ve destekleri ile tez çalışmamı bitirmemi sağlayan danışman hocam Sayın Prof. Dr. N. Yeşim YALÇIN MENDİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmasının yürütüldüğü laboratuvarın kurucusu Sayın Prof. Dr. Selim ÇETİNER'e destek ve katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarımın her aşamasında fikirlerinden yararlandığım, her türlü desteğini esirgemeyen ve ikinci danışman hocam olarak nitelendirebileceğim Sayın Doç. Dr. Mehtap YILDIZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Lisansüstü eğitim hayatımın her aşamasında bilgi ve desteklerini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR hocama teşekkür ederim. Doktora tez jüri üyelerimden Sayın Doç. Dr. İlknur SOLMAZ'a destek ve katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince yardımlarını esirgemeyen Dr. Tolga İZGÜ'ye, Doç. Dr. Pembe ÇÜRÜK'e, Dr. Öğr. Üyesi Başar SEVİNDİK'e, Arş. Gör. Sibel TURAN'a, Arş. Gör. Mehmet TÜTÜNCÜ'ye, Ziraat Mühendisi Şamil ÖZDEMİR'e, Ziraat Yüksek Mühendisi Senem UĞUR'a, Ziraat Yüksek Mühendisi Aycan ALP'e ve Arş. Gör. Dr. Şenay KARABIYIK'a çok teşekkür ederim.

Doktora eğitimim boyunca bana göstermiş oldukları destek ve yardımlarından dolayı Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca her an beni destekleyen aileme ve son olarak doktora eğitimi sürecinde bana göstermiş oldukları destek, yardım ve sabırlarından dolayı eşim Yasemin KOÇAK'a ve kızım Nehir'e sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET	III
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XIV
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	17
2.1. Siklamende Somatik Embriyogenesis Çalışmaları	17
2.2. Siklamende Diğer Doku Kültürü Çalışmaları	27
2.3. Süs Bitkilerinde Somatik Embriyogenesis Çalışmaları	30
2.4. Sentetik Tohum Çalışmaları	35
3. MATERYAL VE METOT	39
3.1. Bitkisel Materyal.....	39
3.1.1. <i>Cyclamen coum</i> var. <i>coum</i>	39
3.2 Metot.....	41
3.2.1. Eksplantların Yüzeysel Sterilizasyonu	41
3.2.2. Eksplantların Hazırlanması ve Kallus Geliştirme Kültürü	43
3.2.2.1. Deneme I.....	45
3.2.2.2. Deneme II.....	48
3.2.2.3. Deneme III	49
3.2.2.4. Deneme IV	50
3.2.2.5. Deneme V.....	50
3.2.2.6. Deneme VI	51
3.2.3. Farklılaşma ve Somatik Embriyoların Çimlenmesi	51

3.2.4. Somatik Embriyoların Elektron Mikroskopu (SEM) ile İncelenmesi	53
3.2.5. Bitkiciklerin Dış Ortama Aktarılması	57
3.2.6. Sentetik Tohum Üretimi	58
3.2.7. Verilerin Analizi	64
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	65
4.1. Yüzeysel Sterilizasyona Ait Bulgular	65
4.2. Deneme I'de Embriyojenik Kültür Bulguları	65
4.2.1. Deneme I'de Kallus Oluşum Bulguları	65
4.2.2. Deneme I'de Embriyo Oluşum Bulguları	68
4.3. Deneme II'de Embriyojenik Kültür Bulguları	77
4.3.1. Deneme II'de Kallus Oluşum Bulguları	77
4.4. Deneme III'de Embriyojenik Kültür Bulguları	77
4.4.1. Deneme III'de Kallus Oluşum Bulguları	77
4.5. Deneme IV'te Embriyojenik Kültür Bulguları	78
4.5.1. Deneme IV'te Kallus Oluşum Bulguları	78
4.6. Deneme V'te Embriyojenik Kültür Bulguları	80
4.6.1. Kallus Bulguları	80
4.7. Deneme VI'da Embriyojenik Kültür Bulguları	81
4.7.1. Kallus Bulguları	81
4.7.2. Deneme VI'da Embriyo Bulguları	84
4.8. Bitkiciklerin Dış Ortama Aktarılması	96
4.9. Sentetik Tohum Bulguları	98
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	103
KAYNAKLAR	107
ÖZGEÇMİŞ	123

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 3.1.	Kurulan sterilizasyon denemeleri	42
Çizelge 3.2.	Tez çalışmasında kullanılan MS besi yeri içeriği	44
Çizelge 3.3.	Denemelerde kullanılan besi yeri ve diğer komponentler	45
Çizelge 3.4.	Deneme I'de kullanılan farklı BBD konsantrasyon ve kombinasyonları.....	46
Çizelge 3.5.	Deneme II'nin deneme planı.....	48
Çizelge 3.6.	Deneme III'ün deneme planı	49
Çizelge 3.7.	Embriyo örneklerinin kurutulmasında uygulanan protokol	54
Çizelge 3.8.	WPM (Woody Plant Medium) içeriği.....	59
Çizelge 3.9.	ROM (Rugini olive medium) içeriği.....	60
Çizelge 3.10.	Sentetik tohum deneme düzeni	61
Çizelge 4.1.	Deneme I'de yaprak ve yaprak sapı eksplantlarından elde edilen kallus oranları.....	67
Çizelge 4.2.	Deneme IV'te elde edilen kallus oranları (%)	80
Çizelge 4.3.	Deneme V'te elde edilen kallus oranları.....	81
Çizelge 4.4.	Deneme VI'dan elde edilen kallus oranları	84
Çizelge 4.5.	Deneme VI'da elde edilen embriyo oranları.....	85
Çizelge 4.6.	Sentetik tohum denemesinde elde edilen embriyo oluşum oranları.....	99



ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 1.1.	<i>Cyclamen</i> türlerinin Dünya üzerindeki yayılış alanları	3
Şekil 1.2.	Siklamen bitkisinin morfolojik yapısı	5
Şekil 1.3.	Somatik ve zigotik embriyogenesiste embriyoların farklı gelişim aşamaları.....	9
Şekil 1.4.	Geofitlerde yapılan sentetik tohum çalışmalarının şematik özeti.....	14
Şekil 3.1.	<i>Cyclamen coum</i> 'un Türkiye'deki yayılış alanı.....	40
Şekil 3.2.	Doğal yayılış gösteren <i>C. coum</i> türü	40
Şekil 3.3.	Yaprak ve yaprak sapı eksplantlarının sterilizasyonu A) Eksplantların antibakteriyel sıvı sabun ile yıkanması, B) Eksplantların çeşme suyu altında bekletilmesi, C) Eksplantların % HgCl ₂ 'de bekletilmesi, D) Eksplantların Domestos®'da bekletilmesi.	43
Şekil 3.4.	Eksplantların hazırlanması ve besi ortamlarına aktarılması A) Yaprak eksplantlarının hazırlanması, B) Yaprak eksplantlarının besi ortamına aktarılması, C) Yaprak sapı eksplantlarının hazırlanması, D) Yaprak sapı eksplantlarının besi ortamına aktarılması	44
Şekil 3.5.	Deneme I'de kullanılan genotipler	47
Şekil 3.6.	Eksplantın hazırlanması A)Yaprak saplarının ince oval diskler şeklinde kesilmesi, B) kesilmiş halde yaprak sapı diski, C) Eksplantların ortamlara aktarılması.....	50
Şekil 3.7.	Deneme VI'da kullanılan <i>in vitro</i> koşullarda somatik embriyogenesis ile elde edilmiş bitkiler	51
Şekil 3.8.	Petride çimlenen ve sonraki aşamada bireysel olarak kültüre alınan bitkicikler.....	52
Şekil 3.9.	Bireysel olarak geliştirme kaplarında kültüre alınan bitkicikler.....	53

Şekil 3.10. Embriyo örneklerinin Johansen çözeltileri içerisinde bekletilmesi	54
Şekil 3.11. Embriyo örneklerinin altın paladyum ile kaplanması.....	55
Şekil 3.12. Embriyo örneklerinin FEI Quanta 650 Field Emission SEM ile analiz edilmesi	56
Şekil 3.13. Bitkiciklerin dış ortama alıştırılması A) Bitkiciklerin musluk suyu altında besi ortamlarından arındırılması, B) Bitkiciklerin kurutma kağıdı üzerinde kurulanması, C) Bitkiciklerin fungusit solüsyonuna daldırılması, D) Bitkiciklerin steril perlit torf karışımı içerisine dikilmesi.	57
Şekil 3.14. Bitkilerin dış ortama aktarıldığı alıştırma serası.....	58
Şekil 3.15. Sentetik tohum üretimi A) Embriyoların sodyum aljinat içinden mikropipet ile alınması, B) Embriyoların kalsiyum klorür içerisine damlatılması, C) Sentetik tohumların kurutma kağıdında kurutulması, D) Sentetik tohumların besi ortamlarına aktarılması.	63
Şekil 4.1. Yaprak sapı ve yaprak eksplantlarında kallus oluşumunun başlangıcı A) Yaprak sapı eksplantında kallus oluşumu, B) Yaprak eksplantında kallus oluşumu.....	66
Şekil 4.2. Elde edilen kallus yapıları A) Embriyojenik kallus yapısı, B) Embriyojenik olmayan kallus yapısı	69
Şekil 4.3. Deneme I'de eksplantlarda kök oluşumu A), B) Yaprak eksplantlarında kök oluşumu, C), D) Yaprak sapı eksplantlarında kök oluşumu (K: Kök, Ka: Kallus)	69
Şekil 4.4. Somatik embriyoların eksplantın alt bölgelerinden oluşması (E: Embriyo).....	71
Şekil 4.5. Somatik embriyoların eksplantın üst bölgelerinden oluşması (E: Embriyo).....	71

Şekil 4.6.	Kallus yapılarının farklılaşarak somatik embriyoların oluşması A) Kallus yığınlarının farklılaşması ile oluşan proembriyonik yapılar, B) pro-embriyonik yapıların farklılaşması ile oluşan globular embriyolar, C), D) Globular embriyolar (FK: Farklılaşmış kallus, PE: Pro-embriyonik yapı, G: Globular embriyo)	73
Şekil 4.7.	Somatik embriyoların farklı gelişim aşamaları A) Globular safha, B) Kalp safhası, C) Kotiledon, D) Torpedo, E) Farklı gelişim aşamaları	74
Şekil 4.8.	Embriyo kültürlerindeki eşzamansız büyüme (G: Globular, Ka: Kalp, T: Torpedo, Ko: Kotiledon, Ç: Çimlenme).....	75
Şekil 4.9.	Kültür başlangıcından bitkiciklere dönüşüm aşamaları A), B) Eksplantlardan ilk kallus oluşum aşaması, C), D) Embriyojenik kalluslardan embriyoların oluşması, E), F) Somatik embriyolar G), H) Somatik embriyogenesis ile elde edilmiş bitkicikler	76
Şekil 4.10.	Deneme II'den elde edilen kallus yapıları	77
Şekil 4.11.	Deneme III'te elde edilen kallus yapıları A) 1 mg/l 2,4-D ve 0,4 mg/l 2-iP içeren ½ MS ortamından elde edilen kallus yapısı, B) 2 mg/l 2,4-D ve 0,8 mg/l 2-iP içeren MS ortamından elde edilen kallus yapısı	78
Şekil 4.12.	Deneme IV'te görülen kallus yapısı	78
Şekil 4.13.	Deneme V'te yaprak sapı disklerinin kültüre alınması ile elde edilen kallus yapıları, A) Eksplantların petrideki genel görünümü, B), C), D) farklı eksplantlara ait kallus yapıları	81
Şekil 4.14.	Deneme VI'dan elde edilen kallus yapıları A) Petriden genel görünüm, B), C), D) Kallusların yakından görünümü	82
Şekil 4.15.	Deneme VI'dan elde edilen embriyolar A) Petriden genel görünüm; B, C) Farklı aşamalarda somatik embriyolar, D) Çimlenme aşamasındaki somatik embriyo	84

Şekil 4.16. Embriyo gelişiminin farklı aşamalarının taramalı elektron mikroskopu ile incelenmesi A) globular safha, B) kalp safhası, C) torpedo safhası, D) kotiledon safhası (S; sürgün, KY; kök-yumru), E) çimlenme başlangıcı (S; sürgün, SU; sürgün ucu Y; yumru, K; kök).	88
Şekil 4.17. Embriyo yüzeylerinde oluşan tüycükler A) Torpedo, B) Kotiledon, C) Çimlenme başlangıcı (T: Tüycük).	89
Şekil 4.18. Farklı gelişim aşamalarındaki hücre yapıları A) Globular, B) Kalp, C) Torpedo, D) Kotiledon, E) Çimlenme.	91
Şekil 4.19. Embriyo gelişim aşamalarının stereo mikroskop ile incelenmesi A) Globular safha, B) Kalp safhası, C) Torpedo, D) Kotiledon, E) Çimlenme başlangıcı, F) Bütün aşamalar.	92
Şekil 4.20. Somatik embriyoların farklı çimlenme şekilleri A), B) Sadece kök oluşumu (Gelişim göstermeyen çimlenme şekli), C), D) kök ve sürgün oluşumu (Gelişim gösteren çimlenme şekli), (K: Kök, S: Sürgün, Y: Yumru).	93
Şekil 4.21. Yaprak eksplantlarında organogenesis sonucu bitkicik oluşumu A) Sürgün oluşumu, B) Uzamış sürgün; C), D), E), F) Organogenesis sonucu oluşan bitkicikler (S: Sürgün, E: Eksplant).	95
Şekil 4.22. Dış ortama aktarılan bitkiler.	97
Şekil 4.23. Sentetik tohumların gelişim aşamaları A) Sentetik tohumların çimlendirme ortamında kültüre alınması, B) Embriyonun kapsül içerisinde uzaması, C, D) embriyonun uzayarak kapsül dışına çıkışı.	98
Şekil 4.24. Sentetik tohum denemesinden elde edilen somatik embriyolar A,B,C) Kapsüllenmiş embriyolardan somatik embriyo oluşumu, D,E) Kapsüllenmemiş embriyolardan somatik embriyo oluşumu.	101

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	: Yüzde
2,4-D	: 2,4-dichlorophenoxyaceticacid
°C	: Santigrat derece
2iP	: 6-(γ , γ -dimethylallylamino)purine
ABA	: Absisik Asit
pH	: Power of Hydrogen (Hidrojenin gücü)
mM	: Milimolar
CaCl ₂	: Kalsiyum Klorür
gr	: Gram
mg/l	: Miligram/Litre
MS	: Murashige & Skoog
μ M	: Mikromolar
RAPD	: Random Amplified Polymorphic DNA
PEG	: Polietilen Glikol
CO ₂	: Karbondioksit
NAA	: Naftalen Asetik Asit
N6	: Chu besi ortamı
B5	: Gambourg besi ortamı
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
FDA	: Flüoresan Diasetat
BA	: Benzil Adenin
TDZ	: Thidiazuron
IAA	: İndol Asetik Asit
BAP	: Benzil Amino Purin

LS	: Linsmaier & Scoog
H ₂ O	: Su
µm	: Mikrometre
m	: Metre
cm	: Santimetre
HgCl ₂	: Civa Klorür
ml	: Mililitre
TBA	: Tersiyer Bütil Alkol
SEM	: Scanning Electron Microscope (Taramalı Elektron Mikroskobu)
WPM	: Woody Plant Medium
ROM	: Rugini Olive Medium
µmol	: Mikromol

1. GİRİŞ

Türkiye ılıman iklim yapısına sahip olup bitki çeşitliliği açısından komşu ülkeler ile karşılaştırıldığında birçok farklı özelliği ile ön plana çıkmaktadır. Ülkemizde yayılış gösteren bitki tür sayısı yaklaşık olarak tüm Avrupa kıtasında yayılış gösteren bitki tür sayısı kadardır. Bu çeşitliliğin temel sebebi bitki türlerinin doğal ortamlarını oluşturan ülkemizin coğrafyasındaki zenginliktir. Dar alanlarda oluşan iklimsel farklılıklar, yapısal özelliklere bağlı çeşitlilikler, farklı tiplerde toprak yapılarının bulunması gibi bir takım coğrafik etmenler bitki yapılarında değişimlere ve dolayısı ile türlerde varyasyona sebep olmaktadır. Ayrıca ülkemizin üç tarafının denizlerle çevrili olması, kuzey ve güney kıyılarının ardında dağların bulunması ve batıdan doğuya gidildikçe yükselti farklılıklarının artması bitki yapılarının farklılaşmasına ve dağlık alanlarda bitki topluluklarının kademelenmesine sebep olmuştur (Avcı, 2005).

Ülkemiz ayrıca endemik türler açısından da oldukça avantajlı bir konumdadır. Ortadoğu ve Avrupa ülkeleri içinde endemik türlerce en zengin ülkelerden birisi olan Türkiye’de, 63 familyada 2651 endemik bitki türü bulunmaktadır. Bazı türlerin alt tür veya varyeteleri de endemik olup, bu sayı alt tür ve varyete düzeyinde 3432’ye ulaşmaktadır. Yurdumuzda 12000 doğal tür ve tür altı taksonu bulunduğu ve bunların 3700’e yakını endemik bitkilerden oluşmaktadır (Arslan ve ark., 2015). Ülkemiz bu zenginliği, farklı iklimsel özellikler gösteren oldukça farklı topografik yapılara sahip olmasına ve 3 farklı gen kuşağında (Avrupa-Sibirya, Akdeniz ve İran-Turan) yer almasına borçludur. Bu nedenle de Anadolu’da çok geniş bir flora çeşitliliği görülmektedir (Çürük ve ark., 2013; Güner, 1994).

Toprak altında besin maddesi depolayan soğan, yumru ve rizom gibi özelleşmiş toprak altı gövdeli bitki gruplarına geofit denilmektedir ve ülkemiz geofitler açısından da oldukça zengin bir coğrafyaya sahiptir (Çetik, 1973). Geofitler ülkemizin florasının % 6’sını oluşturmaktadır ve Türkiye florasında

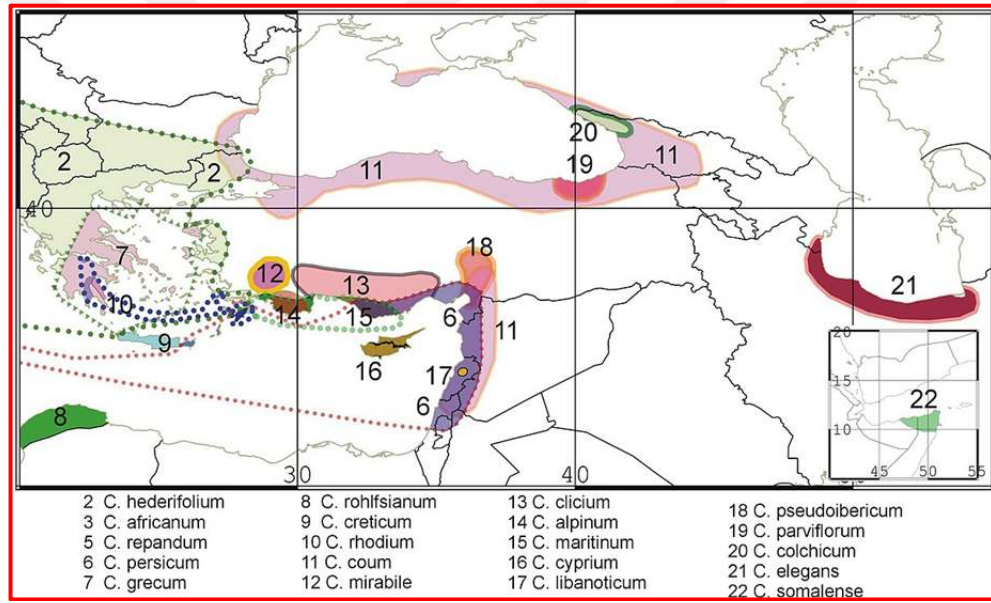
bulunan 12000 türden 688 tanesi geofit grubuna ait bitkilerdir (Özhatay ve Byfield, 2005). Bu geofitlerin 162 tanesi ülkemize endemiktir. Ancak tarla açmalar ve aşırı otlatma, sanayileşme, tarımsal mücadeleler, orman yangınları, kara yollarının yol genişletme ve yol açma faaliyetleri, izinsiz toplayıcılar ve ihraç ürünü olarak kullanılması gibi sebeplerden dolayı ülkemizde endemik olarak yetişen bu geofitler tehdit altındadır (Koçak, 2012). Geofitlerin çoğu tek çenekliler sınıfında yer alırken az bir kısmı çift çenekliler sınıfında yer almaktadır (Koyuncu ve Alp, 2014) ve Amaryllidaceae (30 tür), Ranunculaceae (222 tür), Primulaceae (48 tür), Araceae (31 tür), Geraniaceae (76 tür), Liliaceae (419 tür), Iridaceae (117 tür) ve Oxalidaceae (4 tür) olmak üzere 8 familyadan oluşmaktadır (Avcu, 2011; Özbucak ve ark., 2017).

Geofitlerin vejetasyon süreci ilkbahar ve sonbaharda sıcaklığın uygun seviyelere gelmesi ve yağışlar ile birlikte başlamaktadır. Vejetasyon süreci içerisinde toprak üstü aksamı gelişimini tamamlamakta ve kurumaktadır. Vejetasyon dönemi sonunda kuruyan bitkiler yaz aylarını toprak altındaki depo organlarında biriktirdikleri maddeleri harcayarak geçirmektedirler (Sevindik, 2018). Geofitler, diğer birçok çiçekli bitki ile karşılaştırıldığında gövdelerinin toprak altında olmasından dolayı olumsuz ekolojik faktörlere daha yüksek tolerans göstermektedir (Seyidoğlu, 2009; Sargın ve ark., 2013). Geofitler genellikle 23° kuzey ve 45° güney enlemleri arasında yayılım göstermektedir. Güney Afrika 2000 tür ile en fazla geofit türüne sahip ülke konumundadır. Akdeniz iklimine sahip ülkeler, Amerika ve Avusturalya ise geofit açısından zengin diğer ülkelerdir (Dallman, 1998). Ülkemizdeki geofitlerin çoğu geniş yayılım göstermek için yüksek rakımları ve sulak alanları tercih etmektedirler (Çakır, 2017).

Bazı geofitler süs bitkisi olarak kullanılırken, bazıları da tıbbi aromatik ve gıda olarak tüketilmektedir. Bu türlerin toprak altı organları toplanıp ihraç edildiği için (Çelik ve ark., 2003) ve düşük sıcaklık istekleri, kısa hayat döngüsü ve gösterişli çiçeklere sahip olmaları nedeni ile ekonomik anlamda değerlidir (Fascetti ve ark., 2014). Geofitler süs bitkileri sektöründe geç sonbahardan ilkbahara kadar

uzanan bir süreçte çiçeklenme özelliğine sahip olmaları nedeni ile kesme çiçek olarak kullanıldığı gibi park ve bahçelerin düzenlenmesinde de tercih edilmektedir (Nasırcılar, 2016).

Ülkemizde doğal yayılış gösteren ve ekonomik olarak öneme sahip geofit bitkilerinden bir tanesi de *Cyclamen* cinsidir. *Cyclamen* cinsinin orijin merkezi Akdeniz havzasıdır ve ülkemizde 6'sı endemik olmak üzere 12 takson ile doğal yayılış göstermektedir, ağaç veya çalı gölgelerinde iyi gelişmektedirler (İzgu ve ark., 2016).

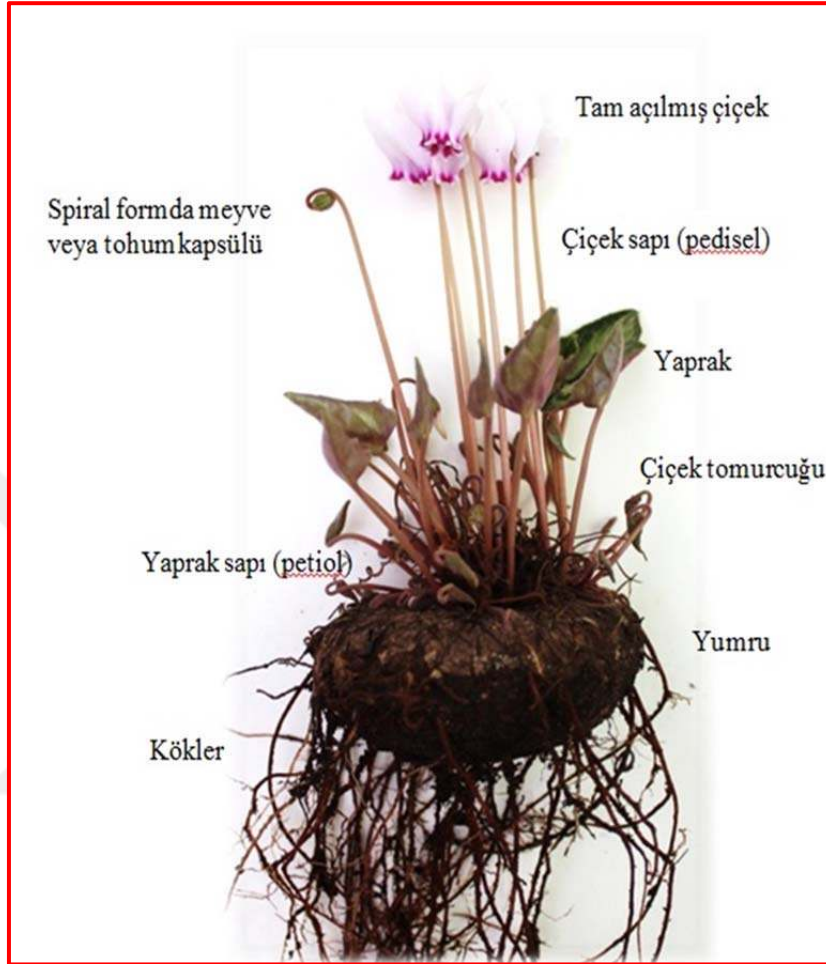


Şekil 1.1. *Cyclamen* türlerinin Dünya üzerindeki yayılış alanları (Wikipedia, 2019)

Cyclamen cinsine ait türlerden bir kısmı ilkbaharda, bir kısmı ise sonbaharda çiçek açmaktadır (Gündoğan, 2003). İlkbaharda çiçek açan türler; *C. persicum* Miller., *C. repandum* Sm-in Sibth. & Sm, *C. pseud-ibericum* Hildebr., *C. coum* Miller., *C. trochopteranthum* O. Schwarz, *C. parviflorum* Pobed'dir. Sonbaharda çiçek açan türler; *C. hederifolium* Aiton., *C. graecum* Link., *C. cilicium* Boiss & Heldr., *C. mirabile* Hildebr'dir. Bu türlerden *C. repandum* Sm-in

Sibth. & Sm., *C. parviflorum* Pobed, *C. pseud-ibericum* Hildebr, *C. trochopteranthurum* O. Schwarz, *C. cilicicum* Boiss & Heldr., *C. mirabile* Hildebr, ülkemize endemik türlerdir (Ekim ve ark., 1991). *Cyclamen* cinsi, ülkemizde Adana, Antalya, Amasya, Artvin, Aydın, Balıkesir, Bolu, Çanakkale, Giresun, İzmir, Kahramanmaraş, Muğla Konya, Mersin, Osmaniye, Rize ve Trabzon illerinde doğal olarak yayılış göstermektedir (Gündoğan, 2003).

Cyclamen ismi, M.Ö. 370-285 yılları arasında yaşamış olan Theophrastus tarafından verilmiş olup latince “kuklamis” ve “kuklamiren” sözcüklerinden türetilmiştir. Kuklos veya cyclos daire anlamına gelmektedir ve siklamenin toprak altı yumrularının yuvarlak, yapraklarının daire şeklinde olması ya da meyve saplarının kıvrımlar yaparak toprağa doğru uzanması nedeni ile bu isim verilmiştir (Tanker ve Türköz, 1984). Siklamen halk arasında tavşankulağı, yer somunu veya domuz turpu gibi isimlerle bilinmektedir.



Şekil 1.2. Siklamen bitkisinin morfolojik yapısı (Yalçın Mendi ve Çürük, 2016)

Siklamen türleri yumrulu kök yapısına sahip ve vejetatif çoğalma özelliği olmayan çok yıllık uzun ömürlü bitkilerdir. Uzun saplı yapraklar yumrunun üst kısmında bulunan floral gövdeden direk çıkmaktadır. Hermafrodit çiçekler floral gövdeden çıkan dik halde duran yapraksız çiçek sapı ucunda bireysel ve asılı olarak bulunmaktadır. Çiçekler nektar üretmemektedir (Grey-Wilson 1988, Çürük 2017). Taç yapraklar yukarı doğru kıvrılmış beş lobtan oluşmuştur ve tabanda beş çanak yaprağı ile birleşmiştir. Anterler, taç yaprak içerisinde yer almaktadır ve çiçek tabanına çok kısa bir filament sapı ile bağlanmıştır. Anter açılması içe dönüktür ve

polen çoğunlukla bir apikal por aracılığı ile serbest bırakılır. Yumurtalık çok sayıda ovül içermektedir. Döllenmeden sonra taç yapraklar düşer ve dik duran çiçek sapı tepeden aşağı doğru kıvrılır. Tohumlar kahverengimsi renktedir ve toprağa salındıkları zaman karıncalar tarafından etrafa yayılmaktadır (Gündoğan, 2003; Çürük, 2017).

Siklamen bitkisi vejetatif gelişme döneminde 15-20, generatif safhada ise 12-15 °C sıcaklık istemektedir. Daha yüksek sıcaklıklar yaprak gelişmesini teşvik ederken, çiçeklenmeyi olumsuz etkilemektedir. Oransal nemin %70 olduğu koşullarda gelişimi çok daha iyi olmaktadır. Siklamen fotoperyodizme duysız görünmekle beraber uzun gün şartlarında ve yüksek ışık intensitesinde çiçek tomurcukları çok miktarda oluşmaktadır. Yetişkin bitkiler için 2000 lux, genç bitkiler için 6000 lux aydınlatma gerekmekte, çiçeklenme sonrası sulama azaltılarak bitki dinlenmeye bırakılmaktadır (Boztok, 2002). Fakat sera koşullarında yapılan yetiştiricilikte kaliteli ve sağlıklı bitki üretimini sağlamak için ışık yoğunluğunun 30.000 lux'ten yüksek olmaması tavsiye edilmektedir. Bu bağlamda yaz döneminde bitkilerin aşırı ışık miktarına bağlı olarak güneş yanıklarından etkilenmemesi için %60 gölgeleme uygulanması önerilmektedir. Siklamen bitkisi için havadar ve drenajı kolay topraklar uygundur. Ağır ve çok nemli topraklar köklerin zarar görmesine yol açarak gelişme bozukluklarına sebep olmaktadır (Çürük, 2013; Sevindik, 2018).

Siklamen cinsinde bir bitkide ortalama 20-30 arasında çiçek bulunmakta ve her çiçekte ortalama 20-50 arasında tohum oluşmaktadır. Doğal yaşam alanlarında çoğalmaları tohumlar ile gerçekleşmektedir (Bossard, 1960). Siklamen kesilerek ya da yumruları ayrılarak vejetatif olarak çoğaltılamamaktadır ve kendileme depresyonu gösterdiği için F1 hibritlerin ebeveyn hatlarının üretimi ve çoğaltımı zordur, tohumları pahalıdır. Bu nedenlerle ıslahçılar özellikle vejetatif üretime önem vermektedirler (Winkelmann, 2010). Bu nedenle siklamende *in vitro* koşullarda vejetatif üretim ön plana çıkmaktadır.

In vitro'da uygulanan teknikler;

- İşgücü maliyetlerinin azaltılması,
- Olumsuz çevre şartlarından etkilenmemesi,
- Mikroçoğaltım için materyal temininin kolay olması,
- Patojen eliminasyonu için materyal elde edilmesinin kolay olması,
- Mevsim koşullarına bağlı kalmaksızın yıl boyu üretimin yapılabilmesi gibi bazı avantajlar sağlamaktadır.

In vitro teknikler, bitki biyoteknolojisinde bitki ıslahı (embriyo kültürü, haploid bitki üretimi, somaklonal varyasyon, *in vitro* seleksiyon, *in vitro* germplazm muhafazası, gen transferi), bitki çoğaltımı (virüslerden arı bitki üretimi, mikroçoğaltım, sentetik tohum üretimi) ve diğer uygulama alanları (sekonder metabolit üretimi, kimera ve temel araştırmalar) için kullanılmaktadır (Özcan ve ark., 2001). *In vitro* teknikler içerisinde sıkça kullanılan somatik embriyogenesis siklamende etkili bir vejetatif çoğaltma yöntemidir (Kiviharju ve ark., 1992; Kreuger ve ark., 1995; Schwenkel ve Winkelmann, 1998; Winkelmann ve ark., 2006; Terakawa ve ark., 2008; Seyring ve ark., 2009; Winkelmann ve ark., 2010; Jalali ve ark., 2010; Prange ve ark., 2010a, b; You ve ark., 2011; Koçak ve ark., 2014; Winkelmann ve ark., 2015; İzgü ve ark., 2016).

Somatik embriyogenesis ilk olarak havuç hücre kültürlerinde Steward ve ark. (1958) ve Reinert (1958) tarafından gözlemlenmiştir. O zamandan bu yana somatik embriyogenesis birçok bitki türünde kullanılmaktadır (Lyngved, 2008).

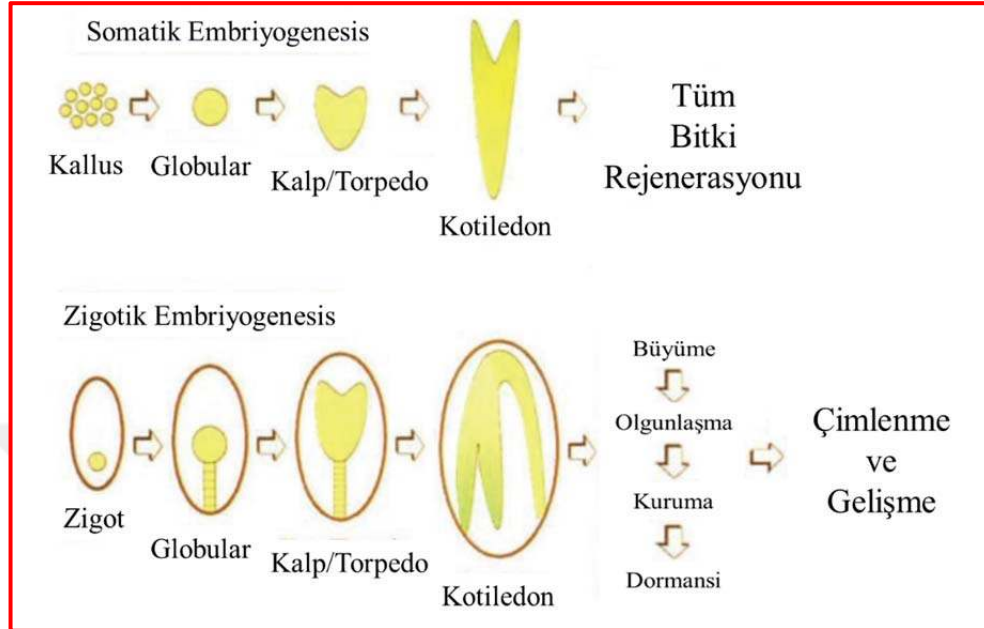
Somatik bir bitki hücresinin, embriyo oluşturmak için ontojenik bütün bir programı yeniden düzenleyebilmesi yeteneği somatik embriyogenesis olarak tanımlanmaktadır. Bu yetenek, kök ve sürgün ekseninin aynı anda bulunduğu bipolar ve kapalı bir vasküler sistemi içeren yapının oluşmasına imkan vermektedir. Somatik embriyogenesis hem tek çenekli hem de çift çenekli bitkilerde oluşmaktadır (Dantu ve Tomar, 2010).

Somatik embriyogenesis, doğada çevre dokularda ya da *in vitro*'da bulunan dış uyaranlara cevap olarak, tek bir hücreden ya da benzer morfolojik veya genetik yapıya sahip hücre gruplarından başlayabilmektedir. Bu uyaranlar, farklı gen transkripsiyon düzeni, morfolojisi ve gelişim şekli içeren hücre yığınlarının oluşmasına sebep olan genetik programı başlatmaktadır (Smertenko ve Bozhkov, 2014).

Somatik embriyogenesis, iki farklı yolla meydana gelmektedir. Bunlardan ilki, arada kallus oluşumu olmaksızın doğrudan organize dokulardan somatik embriyoların oluştuğu direk somatik embriyogenesis, ikincisi ise embriyo oluşumundan önce kallus fazının bulunduğu dolaylı somatik embriyogenesis (Li ve ark., 2017; Radoeva and Weijers, 2014).

Somatik embriyogenesis süreci, embriyogenesisin uyarılması, embriyo gelişimi, embriyonun olgunlaşması ve muhafazasından oluşan farklı aşamaların başarılı bir şekilde gerçekleşmesine bağlıdır. Embriyogenesisin uyarılması ve embriyo gelişimi hücrelerde form değişimi ve somatik embriyo oluşumuna yönlendirici değişimlerin tetiklenmesiyle bağlantılıdır. Embriyo olgunlaşmasında embriyolar çimlenmeye hazırlanır ve son aşama olan embriyoların muhafazası ise *ex vitro* koşullarda somatik embriyolardan gelişen bitkiciklerin hayatta kalma ve devam eden yaşam süreçlerini kapsamaktadır (Dantu ve Tomar, 2010).

Kapalı tohumlularda zigotik embriyogenesis zigot ile başlar ve kotiledon aşaması ile tamamlanır. Bu embriyojenik aşamada meristemler ve sürgün kök gövdesi oluşumu sağlandığı için bitki gelişimi açısından çok önemlidir. Zigotik embriyogenesisin aksine somatik embriyogenesis somatik hücrelerin embriyolara farklılaştığı eşeysel olmayan bir çoğalma işlemidir. Genel olarak somatik embriyoların gelişim aşamaları zigotik embriyoların gelişim aşamalarına benzemektedir (Şekil 1.4.). Ancak somatik embriyolar tamamen ana dokudan fiziksel olarak bağımsız ve ana dokunun bilgi içeriğinden bağımsız gelişirler (Lyngved, 2008).



Şekil 1.3. Somatik ve zigotik embriyogenesiste embriyoların farklı gelişim aşamaları (Zimmerman, 1903'ten çevirilmiştir.)

Eksplant, genotip, büyüme düzenleyiciler ve kültür koşulları somatik embriyogenesisi etkileyen temel faktörlerdir. Bu aşağıda maddeler halinde açıklanmıştır.

1. Eksplant: Farklı eksplant tipleri (anter, polen, ovaryum, yaprak, yaprak sapı, kök, embriyo, olgun kotiledon, çiçek soğanı) somatik embriyogenesis için kullanılmaktadır (Deo ve ark., 2010). Yüksek oranda başarı için eksplantın sağlıklı ve iyi gelişen bitkilerden alınması gerekmektedir. Eksplant, uygun gelişme fizyolojisindeki bitkilerden alındığında birçok bitki kısmı somatik embriyogenesis için kullanılabilir. Ancak genç doku ve organlar genellikle yaşlı doku ve organlara göre daha iyi sonuç vermektedir (Özcan ve ark., 2001).
2. Genotip: Somatik embriyo oluşturma frekansı bakımından türler arasında önemli farklılıklar gözlemlendiği gibi, aynı tür içerisindeki farklı genotip ve

çeşitlerin dahi embriyo oluşturma kabiliyetleri farklı olmaktadır (Özcan ve ark., 2001).

3. Büyüme düzenleyiciler: Yapılan çoğu somatik embriyogenesis çalışmasında somatik embriyoların uyarılması ve geliştirilmesinde benzer yöntem uygulanmaktadır. Embriyojenik hücrelerin oluşturulması için başlangıç ortamında bir oksine ihtiyaç vardır. Embriyojenik hücreler daha sonra somatik embriyoların geliştirilmesi için oksin içermeyen ya da çok düşük seviyede oksin içeren ortamlara aktarılmaktadır. Somatik embriyogenesis uyartımı için en yaygın kullanılan oksin herbisit olarak da kullanılan 2,4-D'dir (Dantu ve Tomar, 2010).
4. Kültür koşulları: Sıcaklık, ışık kaynağı, yoğunluğu ve süresi somatik embriyo oluşumunda etkili olan önemli faktörlerdir (Temiz, 2009). Bazı somatik embriyolar çimlenmek için ışığa ihtiyaç duyarken, bazıları ise karanlık ortamı tercih ederler.

Somatik embriyoların en önemli kullanım alanlarından biri sentetik tohum üretimidir. Sentetik tohum, ilk olarak Murashige (1977) tarafından kapsüllenmiş tek bir somatik embriyo olarak tanımlanmıştır. Sentetik tohum daha geniş olarak tanımlanacak olursa, *in vitro* ya da *ex vitro* şartlarda tohum olarak ekim yapmak için sentetik olarak kaplanmış somatik embriyo, sürgün ucu, hücre yığını gibi dokulardır ve çimlenme özelliklerini depolama sonrası da muhafaza ederler (Magray ve ark., 2017).

Sentetik tohumun bir ya da daha fazla kapsülle çevrili somatik embriyo olduğu ve gerçek tohumun yapısına benzediği düşünülmektedir (Murashige, 1977; Baskaran ve ark., 2015; Cangahuala-Inocente ve ark., 2007; Maqsood ve ark., 2015). Kapsül, jel maddesi ve besin maddeleri, büyüme düzenleyiciler, anti patojenler, biyo denetleyiciler ve biyo gübreler gibi ek maddeler içerir (Rihan ve ark., 2017; Cartes ve ark., 2009) ve sentetik tohumun kullanım ve taşıma sırasında

korunmasını sağladığı gibi uygun koşullar altında gerçek bir tohum gibi çimlenmesini teşvik eder (Zulkarnain ve ark., 2015). Sentetik tohum teknolojisi, nadir bulunan hibritlerin, elit genotiplerin, kısır kararsız genotiplerin ve genetik modifiye bitkilerin büyük ölçekli çoğaltımını ve korunmasına imkan vermektedir (Gantait ve ark., 2015). Ayrıca tohumla çoğaltılamayan ekonomik olarak değerli ürünlerin sezona ve iklim şartlarına bağlı kalmaksızın çoğaltımı için önemli bir seçenektir (Taha ve ark., 2013; Grzegorzcyk ve Wysokińska, 2011).

Sentetik tohum teknolojisi, çıkışından bu yana somatik embriyogenesis, kültür sistemi tasarımlarının iyileştirilmesi, somatik embriyo ve kapsülasyon arasındaki uyumluluğun sağlanmasına yönelik gelişmelerle bağlantılı olarak gelişmiştir (Onishi ve ark., 1994; Çölgeçen ve Toker, 2006). Ancak bu teknoloji, yeterli canlı eksplant üretimi, somatik embriyoların anormal ve asenkron gelişimi, somatik embriyoların uygun olmayan şekillerde olgunlaşması, depolanacak sentetik tohumlarda dormansi ve stres toleransı yetersizliği ve eksplantların bitkiciklere dönüşümünün zayıf olması gibi faktörler tarafından kısıtlanmaktadır (Ara ve ark., 2000).

Sentetik tohumlar, esas olarak kapsüllenmiş kurutulmuş sentetik tohumlar ve kapsüllenmiş hidratlanmış sentetik tohumlar olarak iki gruba ayrılır.

Kurutulmuş sentetik tohumlar: Somatik embriyoların kurutulmasıyla çıplak olarak ya da polietilen glikol içinde kapsüllenenek üretilir. Kurutma işlemi koşullara bağlı olarak yavaş ya da hızlı olarak gerçekleştirilebilir. Hızlı kurumada, sentetik tohumlar bir gece boyunca açık petri kabında kurutulabilirken, yavaş kurutma işlemi bir veya iki hafta sürebilir. Bir bitki türünde kurutulmuş sentetik tohumların elde edilebilmesi için bu bitki türünün somatik embriyolarının kurumaya tolerans göstermesi gerekmektedir.

Hidratlanmış sentetik tohumlar: Somatik embriyogenesis ya da diğer eksplantların hidrojel ile kaplanmasıyla elde edilmektedir. Hidrojel kapsülasyonu, Redenbaugh ve ark. (1987) tarafından kaba yonca somatik embriyolarının kapsüllemesi ile geliştirilmiştir ve bu çalışmadan beri hidrojel kapsülasyon sistemi

en çok tercih edilen sentetik tohum tekniği olmuştur (Sharma ve ark., 2013; Ara ve ark., 2000; Rai ve ark., 2009). Kurutulmuş sentetik tohumlar ile karşılaştırıldığında, hidratlanmış sentetik tohumlar inatçı ve kurumaya hassas somatik embriyolar ile üretilebilirler.

Potasyum aljinat, agar, gelrite, sodyum pestat gibi birçok jel maddesi bulunmasına karşın kalsiyum aljinat en çok kullanılanıdır (Nongdam, 2016; Redenbaugh ve ark., 1987). Yapay tohum tanelerini elde etmek için sodyum aljinat ile kombine edilmiş farklı kimyasallar kullanılmaktadır. Çoğu çalışmada sentetik tohum tanelerini elde etmek için eksplantlar sodyum aljinat ile kaplanarak kalsiyum klorür içerisine damlatılmaktadır.

Sentetik tohum üretiminde tek katmanlı kapsülasyon, çift katmanlı kapsülasyon ve içi boş boncuklar gibi çeşitli kapsülasyon teknikleri kullanılmaktadır.

Tek katmanlı kapsülasyon: Tek katmanlı kapsülasyon tekniği en basit ve en çok tercih edilen hidrojel kapsülleme yöntemidir. Bu kapsülleme tekniği, eksplantların genellikle sodyum aljinat veya kalsiyum aljinat gibi bir hidrojel madde ile kaplanmasıyla ve dış yüzeylerinin kalsiyum klorür veya kalsiyum nitrat çözeltisine damlatılarak sertleştirilmesi ile uygulanmaktadır.

Çift katmanlı kapsülasyon: Çift katmanlı kapsülasyon işlemi tek katman olarak elde edilmiş sentetik tohumların tekrar bir tabaka ile kapsüllenmesiyle elde edilmektedir.

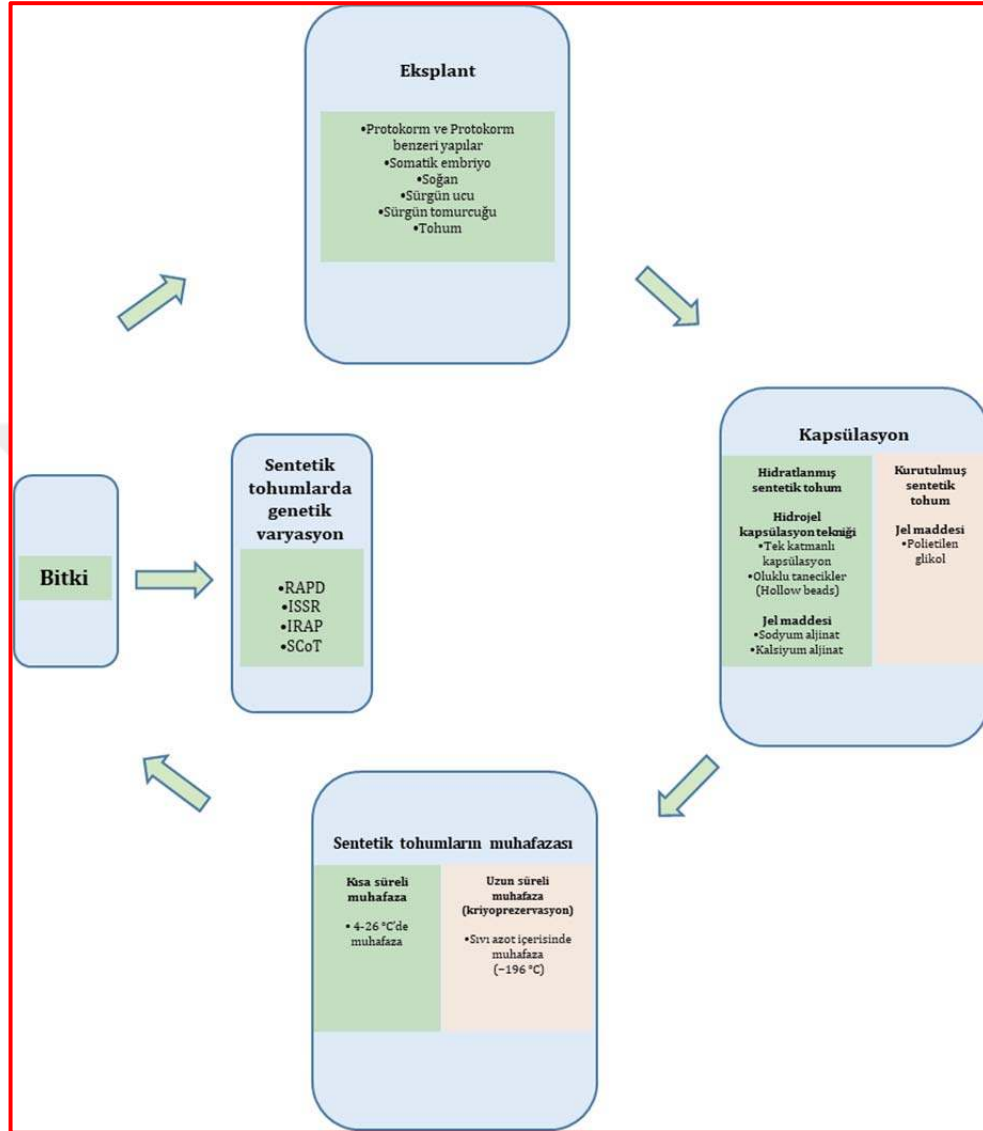
Oluklu tanecikler (Hollow beads): Tek katmanlı sentetik tohumlar çoğunlukla tane yüzeyine yakın bulunmasından dolayı embrioyu korumakta doğal tohumlar kadar yeterli değildir. Oluklu taneciklerin doğal tohumu tek katmanlı sentetik tohumlardan daha iyi taklit ettiği düşünülmektedir. Oluklu taneciklerin bazı avantajları bulunsa da yoğun emek isteyen ve masraflı bir tekniktir (Sharma ve ark., 2013; Patel ve ark., 2000).

Sentetik tohumlar sadece bitki çoğaltması için değil, aynı zamanda bitki genetik kaynaklarının korunmasında da kullanılır. Sentetik tohum teknolojisi bitki

genetik kaynaklarının taşınması, karakterizasyonu, korunması ve genetik kaynakların yönetilmesine farklı bir bakış açısı sağlamıştır (Ahmed ve ark., 2014). Sentetik tohumların depolanması kısa ve uzun olmak üzere iki farklı zaman periyodunda yapılmaktadır.

Kısa süreli muhafaza: Kısa süreli muhafazada başarıyı doğrudan etkileyen en önemli etmenlerden biri depolama sıcaklığıdır. Kısa süreli muhafaza, 4-26 °C arasında değişen sıcaklıklarda gerçekleştirilmektedir. Bazı araştırmacılar en uygun muhafaza sıcaklığının 4 °C olduğunu bildirirken (Saiprasad ve Polisetty, 2003; Nagesh ve ark., 2009; Pradhan ve ark., 2016; Haque ve Ghosh, 2017), bazı araştırmacılar daha yüksek sıcaklıkların uygun olduğunu bildirmişlerdir (Gantait ve ark., 2012; Gantait ve Sinniah, 2013; Mohanty ve Das, 2013; Haque ve Ghosh, 2014; Mahendran, 2014; Haque ve Ghosh, 2016; Baskaran ve ark., 2017; Bhattacharyya ve ark., 2018).

Uzun süreli muhafaza (kriyoprezervasyon): Kriyoprezervasyon, bitki germplazmasının uzun süreli korunmasında etkili bir tekniktir. Bu teknik, dokuların düşük sıcaklıklarda sıvı azot içerisinde (-196°C) veya nadiren buhar fazında (-150°C) depolanmasına dayanır. Bu yöntemde dokuların uzun süre depolanması, metabolik aktivitelerin ve hücre bölünmesinin aşırı düşük sıcaklıklarda duraklatmasına dayanmaktadır. Bu muhafaza yönteminin, uygun maliyetli *in vitro* kültürleri gerektirmesi, minimum alan ihtiyacı duyması, kontaminasyon riskinin az olması ve somaklonal varyasyon riskinin az olması gibi bazı avantajları vardır (Kulus ve Zalewska, 2014). Geofitlerde yapılan sentetik tohum çalışmalarını gösteren şema Şekil 1.5'te verilmiştir.



Şekil 1.4. Geofitlerde yapılan sentetik tohum çalışmalarının şematik özeti

Bu çalışmada, Türkiye’de doğal olarak yayılış gösteren siklamen türlerinden biri olan *Cyclamen coum*’da farklı eksplant tipleri ve farklı bitki büyüme düzenleyiciler kullanılarak somatik embriyogenesis yöntemi ile rejenerasyon protokolünün geliştirilmesi ve elde edilen somatik embriyoların kapsülendirilerek sentetik tohum üretiminin gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Tez

çalışmasında kullanılan *C. coum* türünün soğuğa tolerans göstermesi nedeni ile talep edilen bir tür olması ve literatürde *in vitro* çoğaltımı ile ilgili çok kısıtlı rapor bulunması bu çalışmanın özgün değerini arttırmaktadır.

Tez çalışması kapsamında *C. coum* türünde başarılı bir şekilde somatik embriyolar üretilmiştir ve bu embriyolar dış ortama aktarılmıştır. Ayrıca somatik embriyolar farklı besi ortamları içeren aljinatlar ile kaplanarak sentetik tohumlar elde edilmiştir.





2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Siklamende Somatik Embriyogenesis Çalışmaları

Cyclamen persicum Mill'de zigotik embriyo, ovaryum, anter, yaprak sapı ve çiçek sapı kullanılarak somatik embriyo elde edilmeye çalışılmıştır. Çalışmada ortama eklenen 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) (1.0-1.5) ve hindistan cevizi sütünün embriyogenesisin başlangıç aşamasında önemli olduğu saptanmıştır. Çalışılan eksplantlardan ovaryum ve anter kültürlerinde somatik embriyo oluşumu gözlenmiştir. Ayrıca karanlıkta yapılan kültürün aydınlıkta yapılan kültürden daha etkili olduğu bildirilmiştir. Elde edilen bitkilerin küçük bir kısmı dışında ana bitki ile aynı fenotipik özelliklere sahip olduğu tespit edilmiştir (Kiviharju ve ark., 1992)

Ishizaka ve Uematsu (1993) *C.persicum*'a ait diploid ($2n = 2x = 48$) ve tetraploid ($2n = 4x = 96$) çeşitlerde anter kültürü çalışmaları yapmışlardır. Çalışma sırasında, % 6-12 sükroz ve 2 mg/l NAA hormon içeren N6, B5 ve MS ortamlarında embriyoid yapıları elde etmişlerdir. Çalışma sonucunda embriyoid oluşumunun yüksek sıcaklıkta engellendiğini, düşük sıcaklıkta, özellikle 5°C'de 2 gün boyunca bekletmenin oluşumu teşvik ettiğini rapor etmişlerdir. Ayrıca % 3 sükroz içeren B5 ortamında embriyoidlerin bitkiciklere dönüştüğünü saptamışlardır.

Kreuger ve ark. (1995) *Cyclamen persicum*'da sıvı kültürde somatik embriyogenesis çalışması yapmışlardır. Hücre hatlarını fide yumrularını sıvı ortam içinde doğrudan kültüre alarak başlatmışlardır. Kinetin ve 2,4-D'nin alınımları oranı öncül embriyojenik yapıların (pro-embriyogenik mass) formasyonunda etkili olmuştur. Yüksek oranda embriyojenik hücre hatları sadece öncül embriyojenik yapıların 5-7 hafta içinde oluşmasıyla elde edilmiştir. Öncül embriyojenik yapılar en az 24 ay boyunca çoğaltılmıştır ve her alt kültürde somatik embriyoların üretimi için izolasyon yapılabilmiştir. Hormon içermeyen geliştirme ortamında yüksek sakkaroz içeriği (175 mM) öncül embriyojenik yapılardan etkili bir şekilde

embriyo gelişimini sağlamıştır. Sonraki alt kültürde düşük dozda (58 mM) süktroz kullanılması yumru oluşumunu uyarak çimlenmeyi teşvik etmiştir.

Takamura ve ark. (1995) *C. persicum* fidelerinin farklı vejetatif organlarını kullanarak embriyoid oluşumunu sağlamışlardır. Optimum rejenerasyon, 5.0 µM 2,4-D, 0.5 µM Kinetin ve %3-6 süktroz içeren MS ortamından sağlanmıştır. Embriyogenesinin 25-30°C gibi yüksek sıcaklıklarda arttığını belirlemişlerdir.

Bach ve ark., (1998) *Cyclamen persicum* Mill. F-1 'Medium' in fidelerinden elde edilen farklı eksplantları (kök, hipokotil ve yaprak kısımları), farklı oksin ve sitokinin içeren ortamlarda kültüre almışlardır. Yüksek sitokinin (25 mM 2iP), düşük oksin (2.5 mM NAA) içeren besiyerinde, tüm eksplantlar düşük oranda kallus yada direkt adventif kök ve sürgün oluşturmuştur. Daha sonra somatik embriyolar, 0.5 mM 2,4-D ve 5 mM BA içeren besiyerinde gelişmişlerdir.

Aida ve ark. (1999) *Cyclamen persicum* Mill.'de *Agrobacterium* aracılığı ile bir gen aktarım yöntemi rapor etmişlerdir. Çalışmada etiyolleştirilmiş yaprak sapı segmentleri *Agrobacterium tumefaciens* AGL0 ya da LBA4404 suşu ile enfekte edilmiştir. Rejenerasyon sağlamak için eksplantlar 1.0 mg/l thidiazuron, 1.0 mg/l 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 300 mg/l ticarcillin ve 5 mg/l hygromycin ya da 100 mg/l kanamycin içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Transformasyonun gerçekleşmesi bitki dokularındaki GUS aktivitesinin histokimyasal analizleri ve GUS geninin Southern blot analizi ile teyit edilmiştir.

Hohe ve ark. (1999) *Cyclamen persicum* Mill.'in embriyojenik hücre süspansiyon kültürlerini içeren farklı kültür sistemlerindeki CO₂ birikimini analiz etmişlerdir. Balonsuz ya da kabarcık havalandırmalı biyoreaktör sisteminde, CO₂ mol fraksiyonu %10'un altında tespit edilirken, erlenmayer içerisinde bu miktar %2'den daha az bulunmuştur. Şişelerdeki kültürlerle kıyaslandığında, CO₂ birikimi biyoreaktörlerdeki büyümeyi önemli derecede engellemiştir. Biyoreaktör sistemindeki CO₂'in giderilmesiyle biyoreaktör sistemindeki kültürlerde şişedekiler ile kıyaslanabilir düzeyde hücre büyümesi görülmüştür.

Hohe ve ark. (2001) sıvı kültür ortamında *Cyclamen persicum* Mill'in somatik embriyolarının farklılaşması için inokulum fraksiyonu, sıvı kültür periyodu, globular embriyoların kaplama yoğunluğu ve kaplanmış embriyoların fraksiyonu parametrelerine ilişkin bir protokol geliştirmişlerdir. Ayrıca kültür şişelerindeki materyallere kıyasla globüler ve çimlenmekte olan embriyoların verimini arttıran biyoreaktör sisteminde embriyoların geliştirilmesi gerçekleştirilmiştir. Büyüme düzenleyici içermeyen bir litrelik süspansiyon kültürü ile başlanarak 38 hafta içerisinde 27000 klimatize edilmiş genç bitki elde edilmiştir.

Laura ve ark. (2003) siklamen de yapay tohum üretebilmek için çok sayıda genotipe uygulanabilir somatik embriyogenesis protokolü geliştirmişlerdir. Embriyogenesisin uyarılması 2,4-D kullanılarak sağlanmıştır. Farklı 2,4-D konsantrasyonlarının ve uygulama sürelerinin neden olduğu varyasyonları incelemek için embriyojenik siklamen kalluslarında, RAPD analizi yapılmıştır. Öncelikle kalluslar, 2,4-D (2 mg/l) ve 2iP (0.8 mg/l) içeren ortamlardan ve bir ana bitkiye ait olgunlaşmamış ovaryumlardan elde edilmiştir. Her bir ovaryumdan bir hücre hattı oluşturulmuştur. Embriyojenik kalluslar, daha sonra daha yüksek 2,4-D konsantrasyonlarına aktarılmıştır. Birkaç alt kültürden sonra, kallusların yarısı 2,4-D seviyesine bağlı embriyo oluşturma yeteneğini belirlemek için hormon içermeyen ortamlara aktarılmıştır. Kallusların diğer yarısı ise RAPD analizi için kullanılmıştır. Yirmi beş tesadüfi primer ile toplam 161 tekrarlanabilir bant üretilmiştir. Altı primer, örnekler arasında farklılık olduğunu gösteren bant desenleri oluşturmuştur. Denemelerde kullanılan dört hücre hattı, farklı fenotipik ve genotipik özellik gösteren iki farklı gruba ayrılmıştır. Bir hücre hattında, yüksek 2,4-D konsantrasyonunda kültüre alınan kallusta farklı bir RAPD deseni gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre RAPD analizinin kallus kültürü sırasında genetik varyasyonun erken taranması açısından yararlı bir yöntem olduğu ve stabil hücre hatlarının önceden bilinçli olarak seçilimine imkân sağladığı bildirilmiştir.

Pueschel ve ark. (2003) yaptıkları çalışmada *Cyclamen persicum*'da somatik embriyogenesis ile rejenerasyonun kalıtımını incelemeyi amaçlamışlardır. *In vitro*'da farklı rejenerasyon başarısı gösteren ve kendilenmiş 3 genotip, I₃, F₁ ve F₂ nesillerini elde etmek için kendilerine ve çapraz olarak tozlanmıştır. Bu jenerasyonlar *in vitro*'da tozlanmamış ovüllerin 9.05 mM 2,4-D ve 3.94 mM 2iP içeren kallus teşvik ortamlarında sekiz hafta boyunca kültüre alındıktan sonra sekiz hafta süre ile hormon içermeyen farklılaştırma ortamında kültüre alınmasıyla test edilmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre rejenerasyon yeteneğine çevresel ve fizyolojik etkilerin yanı sıra, ilave modifiye edici genlerin etki edebileceği belirtilmiştir.

Winkelmann ve ark. (2003) *Cyclamen persicum*'un muhafaza edilebilir somatik embriyolarını elde edebilmek için farklı desikasyon koşullarını ve iki farklı rehidrasyon yöntemini denemişlerdir. Ayrıca, uygun olgunlaştırma koşullarını belirlemek amacı ile farklılaştırma süreci boyunca yüksek düzeyde süktroz ve polietilen glikol (PEG 1500) uygulamışlardır. Somatik embriyolar desikatörler içerisinde farklı nisbi nemleri ayarlayan doymuş tuz çözeltileri üzerinde kurutulmuştur. Kurutma işleminden sonra embriyolar, 4 saat süre ile % 98 nisbi nemde ön dehidrasyon işlemine tabi tutulmuşlardır. Sadece hormonsuz sıvı kültür içinde bekletilme sonrasında yumru, kotiledon ve kökler oluşmuştur. Yavaşça kurutulan, % 24 ve daha yüksek nem seviyesine sahip embriyolar çimlenebilmiştir. Ancak azalan nispi nemlerde kurutma işlemi, % 12 gibi çok düşük su içeriği ile sonuçlanmıştır. Azalan nispi nem uygulandığında kuru madde içeriği yüksek somatik embriyolarda % 60'a varan çimlenme oranları görülmüştür. Somatik embriyoların kalitesine bağlı olarak denemeler arasında önemli farklılıklar görülmüştür. Çimlenen embriyolar kurutulmayan kontrol grubundan daha büyük yumru oluşturmuşlar ve daha kaliteli kotiledonlar geliştirmişlerdir. Farklılaşma sürecinde 3 hafta boyunca besi ortamına litre için 60 gr süktroz eklenmesi daha fazla kuru madde içeriğine sahip ve kurumaya toleransı fazla olan embriyoların oluşmasını sağlamıştır.

Winkelmann ve ark. (2004) sıvı kültür kullanarak *Cyclamen persicum*'da somatik embriyo üretimi sağlamışlardır. Sentetik tohum geliştirmek için elde ettikleri embriyoları globular aşamada iken iki farklı enkapsulasyon tekniği ile (klasik aljinat taneleri ve oluklu tanecikler) kaplamışlardır. Aljinat taneleri ile kaplanmış embriyolar, kaplanmamış embriyolar kadar yüksek oranda (% 97) çimlenme göstermişlerdir. Ancak çimlenme daha geç gerçekleşmiştir. Hollow beads tekniği ile kaplanmış embriyolar ise % 71 oranında ve geç çimlenmiştir. Hollow beads ile kapsüllenembriyolar kapsül içinde gelişmişlerdir ancak kapsül dışına çıkışları aljinat ile kaplı olanlara göre daha zor olmuştur. Dört hafta süresince 4°C'de yapılan muhafaza, kapsüllenmiş embriyolarda olduğu gibi kontrol grubunda da canlılığın azalmasına neden olmuştur. Kapsül içerisine besi ortamı ilave edilmesi her iki kapsülleme tekniğinde de çimlenme hızında artışa neden olmuştur.

Winkelmann ve Serek (2005) iki ıslahçıya ait farklı çiçek rengi ve farklı büyüme tiplerine sahip *Cyclamen persicum* çeşitlerinin somatik embriyogenesis oluşturabilme yeteneklerini test etmişlerdir. Her çeşitten 5 adet bitki ve her bitkiden de 100 ovül alınarak deneme kurulmuştur. Kallus oluşturma kültüründe hormon olarak 9.05 µM 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyaceticacid) ve 3.94 µM 2iP (6-(γ,γ-dimethylallylamino) purine) kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan 32 çeşitten sadece birinde somatik embriyo oluşumu gözlenmemiştir. Rejenerasyon oranı çeşitlere göre %0 - 65 arasında değişiklik göstermiştir. Midi tipi *Cyclamen persicum* çeşitleri, mini ve giganteum tipi çeşitlerine göre daha düşük oranda rejenerasyon göstermişlerdir. Alev renkli çiçeklere sahip çeşitlerde yüksek oranda rejenerasyon gözlenmiştir.

Winkelmann ve ark. (2006) yaptıkları çalışmada *Cyclamen persicum*'a ait zigotik embriyoları, litrede 30 ve 60 gr süktroz içeren sıvı ortamlarda büyüyen somatik embriyoları, her iki tipte çimlenen embriyoları ve endospermi proteomik düzeyde sistematik olarak karşılaştırmışlardır. Zigotik embriyolarda eksprese edilen proteinlerin %74'ü litrede 60 gr süktroz içerisinde kültüre alınan somatik

embriyolarla benzer miktarda bulunmuştur. Litrede 30 gr süktroz içerisinde kültüre alınan somatik embriyolar, 60 gr süktroz ile kültüre alınanlardan daha az protein depolamıştır. Glikolize dahil olan dört enzim (UDP-glikoz pirofosforilaz, fruktoz bifosfat aldolaz, triosfosfat izomeras ve gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz GAPDH) spesifik olarak somatik embriyolarda uyarılmıştır. MS ile tanımlanan 11S globulin proteinleri, somatik embriyolar, zigotik embriyolar ve endospermde yüksek seviyelerde bulunurken, 7S globülinler esasen endosperm ve zigotik embriyolarda tespit edilmiştir. Ksiloglukan endotransglikosilazların, endosperm dokusunda yüksek miktarda eksprese olduğu tespit edilmiştir.

Diğer bir çalışma'da ticari bir çeşit olan *C. persicum* Mill cv. Halios'da somatik embriyogenesis çalışmaları yapılmış ve somatik embriyodan sağlanmış olan bitkiciklerin fenolojik özellikleri incelenmiştir (Savona ve ark., 2007).

Agrobacterium yöntemi kullanılarak somatik embriyolarda rejenerasyon sağlanmış ve higromisin fosfotransferaz, neomisin fosfotransferaz ve beta-glukoronidaz genleri transforme edilmiştir. Rejenerasyon ortamında 1 mg/l benzilaminopürin, 0.01 mg/l alfa-naftalenasetik asit ve 0.2 mg/l gibberellin kullanılmıştır. Araştırma sonucunda 14 higromisine dayanıklı embriyolardan, higromisine dayanıklı klonlar elde edilmiştir (Terakawa ve ark., 2008).

Seyring ve ark (2009) yaptıkları çalışmada yetişkin bitkilerin eksplantlarını kullanarak alt tür ve çeşitlerini de içeren farklı sıklamen türlerinde (*C. Africanum* Boiss. and Reut., *C. cilicium* Boiss. and Heldr., *C. coum* Mill., *C. hederifolium* Ait., *C. persicum* Mill., *C. purpurascens* Mill.) *in vitro* çoğaltım imkanlarını araştırmışlardır. Yaprak, yaprak sapı, çiçek sapı ve plasentalı ovul olmak üzere dört farklı eksplant tipi ile iki farklı protokol 11 farklı genotipte uygulanmıştır. Kullanılan bu protokoller, tüm genotiplerde somatik embriyo benzeri yapılara ve/veya adventif sürgün oluşumuna yol açmıştır. Araştırmada kullanılan her bir genotipin, yetişkin bitki eksplantı kullanılarak bir yıldan daha kısa bir sürede *in vitro* koşullarda çoğaltılması mümkün olmuştur.

Bian ve ark. (2010) *Cyclamen persicum*'da globular, torpedo ve çimlenme aşamalarındaki somatik embriyoları, embriyojenik olmayan kallusları ve zigotik embriyoları detaylı proteomik ve kütle spektrometrik analizleri ile inceleyerek, somatik embriyo gelişimini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda elde edilen veriler, spesifik proteinlerin somatik embriyogenesinin düzenlenmesinde etkili olduğunu göstermiştir.

Jalali ve ark. (2010) *Cyclamen persicum*'da farklı eksplant tiplerinin (yaprak ve yaprak sapı) kallus uyartımı ve somatik embriyo oluşumu üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Embriyojenik kalluslar, 2,4-D ve Kinetin içeren farklı ortamlardan elde edilmiştir. Her iki eksplant tipinde de en yüksek kallus oluşumu, 1 mg/l 2,4-D ve 0,5 mg/l Kinetin içeren ortamdan elde edilmiştir. Optimum somatik embriyogenesis sonuçları, yaprak eksplantı ile 4 mg/l 2,4-D ve 0,1 mg/l Kinetin içeren ortamdan alınmıştır.

Prange ve ark. (2010a) üç yabancı siklamen türünde (*Cyclamen graecum* Link, *Cyclamen mirabile* Hildebrand, *Cyclamen trochopteranthum* Schwarz (syn. *Cyclamen alpinum* hort. Dammann ex Sprenger)) fide dokusundan kallus kültürlerinin kurulması ve somatik embriyogeneze yolu ile bitkilerin rejenerasyonu edilmesi ve protoplasttan bitkiye dönüşümü sağlayan protokolün geliştirildiği ilk raporu sunmuşlardır. Kallus oluşturma yeteneği her tür içinde genotipten güçlü bir şekilde etkilenmiştir. Kültür ortamı, büyüme düzenleyicilerinin farklı konsantrasyonu, CaCl₂ ve aktif karbon, embriyo oluşumunu önemli derecede etkilemiştir. *C. mirabile* türünde 0,5 gr kallustan 1461 kadar embriyo elde edilmiştir. Farklı siklamen türlerinin, iki farklı daldırma ajanı (agaroz ve aljinat) içerisinde protoplastların farklı gelişim gösterdikleri gözlemlenmiştir. Her iki protoplast sisteminde de somatik embriyo rejenerasyonu sağlanmıştır ve bitkiler yetiştirilerek sera koşullarına adapte edilmiştir.

Prange ve ark. (2010b) *Cyclamen coum*'da katı ve sıvı kültürde embriyojenik kültürler kurmuşlardır. Denemelerde bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı konsantrasyonlarına verdikleri cevapları incelemişlerdir. Embriyojenik

kültürler her bir gram taze kütleden 876 somatik embriyo üretecek kapasite göstermiştir. Somatik embriyo ve embriyojenik süspansiyon kültürlerinden gram başına 4.24×10^5 protoplast izole edilmiştir. Hem embriyolardan hem de süspansiyon kültürlerinden elde edilen protoplastlar, başarılı bir şekilde *in vitro* koşullarda kültüre alınmış ve somatik embriyogenesis yöntemi ile bitkilere dönüşümü sağlanmıştır. Fenotipik analizler ve flow stometri ölçümleri elde edilen bazı bitkilerin tetraploit yapıda olduğunu göstermiştir. Protoplasttan elde edilen kallusların rejenerasyon için kullanıldığı bitkilerde %20 oranında tetraploidi görülürken, embriyojenik kültürlerden rejenere olan bitkilerde bu oran, %0.9 olarak tespit edilmiştir.

Winkelmann ve ark. (2010), daha önce geniş bir siklamen genotipinde tanımlanmış olan somatik embriyogenesis protokolünü, kesme çiçek olarak kullanılan 30 farklı siklamen genotipinde ilk defa kullanmışlardır. Araştırmacılar bu çalışmada kullanılan somatik embriyogenesis ile gerçekleştirilen rejenerasyonun etkinliğini, elde edilen bitkilerin genetik saflığını ve genç bitkilerin üretim maliyetlerini test etmeyi amaçlamışlardır. Genotip, %8 ile %80 arasında değişkenlik gösteren kallus oluşumunu ve %0 ile %92 arasında değişim gösteren kallustan embriyoya değişim oranını önemli derecede etkilemiştir. Kullanılan 30 genotip içerisinde 27 tanesinden bitki elde edilirken, sadece 3 genotipte rejenerasyon sağlanamamıştır. Toplamda 2783 rejenerant seraya aktarılmıştır ve bunların 2003 tanesi (%72) klimatize edilmiştir. Bazı genotipler çiçek rengi ve çiçek şekli açısından oldukça üniform iken, bazı genotiplerde somaklonal varyasyon tespit edilmiştir.

Ekonomik öneme sahip siklamen bitkisinin somatik embriyogenesis ile çoğaltımı etkili bir şekilde yapılabilir ancak senkronize olmayan embriyo gelişimi ve fizyolojik düzensizlikler somatik embriyogenesisi sınırlayan etmenlerdir. Bu sorunların üstesinden gelebilmek için siklamende embriyogenesisdeki fizyolojik süreçlerin iyi bir şekilde bilinmesi gerekmektedir. Bu amaçla **Rode ve ark. (2011)** siklamene ait somatik ve zigotik embriyoların proteomlarını karşılaştırmalı olarak

incelemiştir. Tespit edilen 247 proteinin % 55'i glikoliz, protein katlanması ve strese tepki olmak üzere sadece üç fizyolojik sürece ait bulunmuştur. Strese tepki süreci özellikle somatik embriyolarda baskın görülmüştür. Glikolitik enzim olan enolaze, dikkat çekici bir şekilde en sık tespit edilen protein olmuştur ve siklamende embriyogenesis sürecinde önemli bir rol aldığı sanılmaktadır.

Takamura ve ark. (2011) *Cyclamen persicum* Mill.'de anter kültürünün rejenerasyon etkinliğini arttırmak için karbon kaynağının etkisini araştırmışlardır. Kage Yellow x Anneke (F1)'e ait anterler farklı karbon kaynakları (sükroz, glukoz, früktoz ve maltoz) içeren ortamlarda mikrosporlardan bitki rejenere etmek için kültüre alınmıştır. En fazla miktarda embriyoid oluşumu maltoz içeren ortamdan elde edilmiştir. Kage Yellow x Anneke (F1)'e ek olarak beş farklı siklamen genotipine ait anterler, sükroz ve maltoz içeren ortamlarda test edilmiştir. Kullanılan beş genotipin tamamından da bitki elde edilemezken, dört genotipte maltoz içeren ortamda embriyoid oluşumu gözlenmiştir. Kage Yellow x Anneke (F1) için optimum maltoz konsantrasyonu, 394.4 mM olarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar maltozun siklamende anter kültürü ile rejenerasyonda etkili bir karbon kaynağı olduğunu göstermektedir.

C. persicum'da yüksek frekanslı döngüsel ikincil somatik embriyo (SSE) sistemi, **You ve ark. (2011)** tarafından kurulmuştur. Buna ek olarak farklı gelişim aşamalarında birincil somatik embriyoların (PSES) etkisi, geçişlerinin sayısı, absisik asit (ABA) ve ikincil somatik embriyo üzerine sakkaroz konsantrasyonlarının etkileri incelenmiştir. Farklı gelişim aşamalarında ilk somatik embriyolar, 2 mg/l 2,4-D ve 0.2 mg/l BA içeren 1/2 MS ortamından elde edilmişlerdir. Daha sonra elde edilen embriyojenik kalluslar, hormonsuz ortama aktarılarak ikinci embriyo üretimine teşvik edilmiştir. Bu çalışmada kalluslardan %90 oranında SSE elde edilmiştir.

Koçak ve ark. (2014) Türkiye'de doğal olarak yetişen *Cyclamen persicum* türünde yaptıkları somatik embriyogenesis çalışmasında eksplant kaynağı olarak ovul, ovaryum, yaprak ve yaprak sapını kullanmışlardır. Embriyojenik kallus

oluşumu için hormon olarak 2 mg/L 2,4-D ve 0,8 mg/L 2iP kullanmışlardır. Çalışmada eksplantlardan kallus ve embriyo oluşum oranları incelenmiş, elde edilen oranlar farklı eksplant tipleri için istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur. En yüksek kallus oluşturma oranı yaprak sapı, ovaryum, ovul ve yaprak eksplantlarından olmak üzere sırası ile %34.3, %30.16, %26.6 ve %16.6 olarak tespit edilmiştir. Embriyo oluşumunda ise en iyi sonucu %11.3 ile ovaryum eksplantı verirken, yaprak sapı, yaprak ve ovul eksplantları da sırası ile %8, %4.16 ve %2.83'lük oranları ile embriyo üretimini sağlamışlardır.

Winkelmann ve ark. (2015) *Cyclamen persicum*'da zigotik embriyoları referans alarak somatik embriyolarda metabolomik analizler yapmışlardır. Zigotik ve somatik embriyolar torpedo safhasında iken metabolit profilleri karşılaştırılmıştır. Endosperm ve testadaki major metabolitler belirlenmiştir. Bu çalışmada, farklı dokulardan toplamda 52 farklı metabolit belirlenmiştir. Endosperm ve testadaki temel elementler saptanmıştır. Bunlardan en önemli farklılığı oluşturan metabolit prolin olarak tespit edilmiştir. Prolin, zigotik embriyolarda somatik embriyolarda tespit edilenden yaklaşık 40 kez daha fazla bulunmuştur.

İzgü ve ark. (2016) Türkiye'ye endemik 4 siklamen türü (*C. cilicium* Boiss. et Heldr., *C. parviflorum* Pobed., *C. mirabile* Hildebr. ve *C. pseudibericum* Hildebr.) için etkili bir rejenerasyon protokolü geliştirmişlerdir. Çalışmada ovül, ovaryum, yaprak ve yaprak sapı olmak üzere 4 farklı eksplant tipini kullanmışlardır. Bitki büyüme düzenleyicisi olarak, 2,4-D ve 2iP'nin 13 farklı kombinasyonu denenmiştir. Embriyo benzeri yapıların türlere göre bitkiciklere dönüşüm oranı *C. mirabile*, *C. cilicium*, *C. pseudibericum* ve *C. parviflorum* için sırası ile %38, %31, %16 ve %15 olarak tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışmada her tür ve eksplant tipi için en uygun besi ortamı kombinasyonu belirlenmiştir.

2.2. Siklamende Diğer Doku Kültürü Çalışmaları

Doğal *C. persicum* 'larda *in vitro* sürgün rejenerasyonunu sağlamak amacıyla yaprak diskleri, petal, çiçek sapı eksplantları, TDZ (0, 0.0022, 0.022, 0.22, 2.2 mg/l) ve 6 benzyladenine 0, 1, 2, 3 mg/l BA) içeren 1/3 MS ortamına aktarılmıştır. BA içeren ortamlarda sürgün rejenerasyonuna rastlanmamıştır. En yüksek sürgün oranı pedüncül eksplantlarından ve 0.22 mg/l TDZ içeren ortamdan elde edilmiştir (**Karam ve Majathoub, 2000**).

Organogenesis yöntemi kullanılarak yabani siklamenlerin yumru, petiol, kotiledon ve kök eksplantları, 1.1 mg/l NAA ve farklı BA içeren MS ortamlarında kültüre alınmışlardır. BA, TDZ ve Zeatin'in organogenesis üzerine olan etkileri araştırılmıştır. En yüksek sürgün sayısı ve oranı yumru eksplantlarından ve 2 mg/l BA içeren ortamdan elde edilmiştir (**Mohannad ve Karam, 2000**).

Abu-Qaoud (2004) *Cyclamen persicum* Mill.'de fide dokularını kullanarak *in vitro* sürgün rejenerasyonu ve mikro yumru oluşumu üzerine bir çalışma yapmıştır. "Concerto" çeşidine ait yumru, yaprak ve yaprak sapı eksplantları, MS ortamında kültüre alınmıştır. BBD olarak üç farklı düzeyde (BA) (4.4, 8.8, 13.3 μ M) ve dört farklı düzeyde (TDZ) (0.5, 1, 2, 4 μ M) kullanılmıştır. Bütün besi ortamlarına 5.4 μ M NAA eklenmiştir. Sitokinin içermeyen ortamlarda herhangi bir sürgün rejenerasyonu görülmemiştir. En yüksek sürgün rejenerasyonu %100 ile yumru parçalarının kullanıldığı 4.4 μ M BA ve 4 μ M TDZ içeren ortamdan elde edilmiştir. Yaprak saplarından rejenerasyon sağlanamamıştır. En yüksek mikro yumru oluşumu yaprak eksplantlarından, 2 μ M TDZ (% 41.6) ve 4 μ M TDZ (% 58.3) içeren ortamlardan elde edilmiştir.

Winkelmann ve ark. (2004) *Cyclamen persicum*'da süspansiyon kültürlerinin kriyoprezervasyonu için karmaşık ekipmanlar gerektirmeyen bir protokol geliştirmişlerdir. Kriyoprezervasyon için bu protokolün başarılı bir şekilde uygulanabilmesi amacı ile kültür öncesi ve muamele öncesi hücre gelişimi dönemlerinde uygulanan farklı kriyoprotektanların kriyoprezervasyon sonrası yeniden gelişime etkisini test etmişlerdir. Kriyoprezervasyon denemeleri alt kültür

sonrası 7-10 günlük süspansiyon kültürleri kullanılarak yapılmıştır. İki günlük ön kültür süresince uygulanan farklı kriyoprotektanlar arasından çözündürme sonrası en yüksek yeniden büyüme %75'lik oranla 0.6 M süktroz uygulamasından elde edilmiştir. Ayrıca dondurma işleminden hemen önce 1 saat boyunca 0.6 M süktroz ve %10 DMSO (dimetilsülfoksit) ile ön işlem uygulamak yeniden büyüme üzerine olumlu etki yapmıştır. Kriyoprezervasyon sonrası yeniden yetiştirilen kalluslar dondurulmamış kalluslar ile benzer oranda büyüme göstermiştir ve dondurulmamış kalluslardan daha yüksek sayıda embriyo üretmişlerdir. FDA (flüoresan diasetat) boyama kullanarak canlılık üzerine yapılan mikroskopik çalışmalar, sadece birkaç küçük embriyojenik hücrenin kriyoprezervasyona dayanırken, vakuol birikimi yapmış tek hücrelerin yaşayamadığını göstermiştir.

Bürün ve Şahin (2009) *Cyclamen alpinum* tohumlarının *in vivo* ve *in vitro*'da çimlenmesi üzerine yaptıkları çalışmada tohumları 8 ay boyunca farklı depolama yöntemleri kullanarak depolamışlar ve 15 °C ve 20 °C'de *in vitro* ve *in vivo* çimlenme testlerine tabi tutmuşlardır. Kapsüllü ve kapsülsüz halde yapılan tohum muhafazasının, MS besi ortamı kullanılarak yapılan *in vitro* çimlenmeye önemli bir etkisi bulunmamıştır. Ancak tohumun kapsül içerisinde muhafaza edilmesi filtre kağıdı içinde ve *in vivo*'da (tof, perlit ve kum karışımı) çimlendirilmesine önemli etki yapmıştır. Karanlıkta hem *in vitro* hem de *in vivo*'da 15 °C ve 20 °C'de yapılan çimlendirme testlerinde yüksek oranda çimlenme görülmüştür. Ancak 15 °C'de çimlenme daha hızlı gerçekleşmiştir.

Prange ve ark. (2012) Polietilen glikol (PEG) aracılı protoplast füzyonu uygulanarak *Cyclamen persicum* ($2n = 2x = 48$) ve *Cyclamen coum* ($2n = 2x = 30$) arasında ilk kez somatik melezler elde etmişlerdir. Heterofüzyon, floresin diasetat ve skopoletin ile çift floresan boyama yapılarak tespit edilmiştir. En yüksek heterofüzyon frekansı (yaklaşık %5), protoplast yoğunluğu 1×10^6 /ml olan ve %40 PEG kullanılan protokolden elde edilmiştir. *C. coum*'un DNA içeriğinin *C. persicum*'dan 4.6 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Füzyon denemelerinden elde edilen 200 bitkiden çoğu *C. coum*'a benzerlik gösterirken, 5 tanesi *C.*

persicum'a ait fenotipik özellik göstermiştir. Kırk altı bitki ise karışık morfolojik özellik göstermiştir. Flow stometri ile altı adet aday hibrit tespit edilmiştir. Ribozomal nükleer DNA'daki 5.8S geninin sekansına ve yakınında bulunan (internal transcribed spacer) ITS1 ve ITS2'ye göre türlere özgü bir DNA markörü geliştirilmiştir. Türe özgü DNA markörü ve amplifikasyon ürünlerinin sekanslanması ile sadece bir bitkinin hibrit olduğu doğrulanabilmektedir.

Mwangi ve ark. (2013) *Cyclamen persicum* endospermi içindeki hücresel ve fizyolojik süreçleri aydınlatmak için bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada histolojik analizler tozlanmadan 0-11 hafta arasında yapılmıştır. Tozlanmadan 3 hafta sonra, globular zigotik embriyo ile birlikte bir sinsityum açık bir şekilde görülebilmektedir. Tozlanmadan 4 hafta sonra endospermin hücreleşmesi, 5 hafta sonra küçük bir torpedo şeklinde embriyo ve 7 hafta sonra hücre genişlemesi gözlenmiştir. Tozlanmadan 11 hafta sonra endosperm tamamen farklılaşmıştır. Toplam çözünebilir proteinler, tozlanmadan 4, 5, 7, 9 ve 11 hafta sonra endospermden ekstrakte edilmiştir. Absisik asit sinyalizasyonunda rol oynayan proteinlerin ve oksidatif strese duyarlı proteinlerin *Cyclamen*'de tohum gelişimi için önemli olduğu tespit edilmiştir.

Ratjens ve ark. (2018) gen fonksiyon analizlerini sağlamak için, *Cyclamen persicum*'da *Agrobacterium tumefaciens* aracılığı ile genetik transformasyon protokolünü geliştirmişlerdir. Transformasyon için *A. tumefaciens*'in EHA105 ve LBA4404 en etkili suşlar olmuştur ve sırası ile %43 ve %20'ye varan transformasyon verimi sağlamışlardır. Rejenere olan bitkilerde transgenlerin varlığı PZR, southern hibridizasyonu ve histokimyasal GUS analizi ile doğrulanmıştır. Araştırmacılar geliştirdikleri bu protokolü, iki farklı *Cyclamen persicum* genotipine başarılı bir şekilde uygulanmıştır.

2.3. Süs Bitkilerinde Somatik Embriyogenesis Çalışmaları

Sage ve ark. (2000) *Narcissus pseudonarcissus* cvs. Golden Harvest and St. Keverne'e ait soğan ve sürgün kültüründeki yaprakları kullanarak somatik embriyo üretimi yapmışlardır. Yaprak laminası, yaprak tabanı, soğan katmanı ve çiçek sapı ile yapılan ilk denemelerde, somatik embriyolar üretilmiştir. Embriyogenesis farklı konsantrasyonlarda 2,4-D ve BAP içeren ortamlarda gerçekleştirilmiştir. Diğer BBD kombinasyonlarına göre 5 mM 2,4-D ve 0.5 mM ya da 5 mM BAP içeren ortamlar önemli düzeyde daha fazla somatik embriyo üretmiştir. Çiçek sapı eksplantları diğer eksplantlardan daha erken somatik embriyo üretmiştir. Sürgün ucu kültüründen alınan yapraklar, 2,4-D ya da NAA ile kombine edilen ortamlarda somatik embriyo üretirken, piklorom içeren ortamlarda üretim sağlanamamıştır. Somatik embriyolar, 4.9 mM IBA'ya ek olarak 4°C'de soğuk uygulaması ile etkili bir şekilde bitkilere dönüşmüştür.

Tanaka ve ark. (2000) *Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura cv. Aboukyu'da ray floret eksplantlarından yüksek konsantrasyonda IAA ve Kinetin içeren MS ortamı kullanarak somatik embriyogenesis sürecini incelemişlerdir. NAA içeren ortamda somatik embriyogenesis uyartımı sağlanmıştır, ancak IBA ve 2,4-D'de başarı sağlanamamıştır. BAP ve thidiazuron gibi diğer sitokininler de etkili olmamıştır. Yüksek BAP konsantrasyonlarında çok sayıda adventif sürgün oluşurken, farklı konsantrasyonlarda BAP ve Kinetin ile düşük konsantrasyonlarda IAA içeren ortamlarda embriyo oluşumu görülmemiştir. Bitkiler etkili bir şekilde elde edilen embriyolardan rejenere edilmiştir.

Shinoyamai ve ark. (2004) krizantemde [*Dendranthema x Grandiflorum* (Ramat.) Kitamura] etkili ve basit bir somatik embriyogenesis protokolü geliştirmişlerdir. En iyi somatik embriyo üretimi, 2 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l Kinetin içeren MS ortamından sağlanmıştır. En yüksek embriyodan bitkiye dönüşüm frekansını 1-2 mm uzunluğundaki köklere sahip embriyolar vermiştir. Kök meristemleri kültür başlangıcından 20 gün sonra somatik embriyolarda oluşurken, sürgün uçları hormon içermeyen ortamlara aktarıldıktan sonra oluşmaya

başlamıştır. Rejenere olan bitkilerin büyüme süreçleri, yaprak ve çiçek morfolojisinin normal olduğu, ancak çiçeklerin kesim gününün kontrol bitkilerinden farklı olduğu bildirilmiştir.

Emek ve Erdağ (2007) *in vitro* koşullarda yan tomurcuklardan elde edilen sürgünlerin yapraklarını kullanarak *Gladiolus anatolicus* (Boiss.) Stapf'ta somatik embriyogenesis protokolü geliştirmişlerdir. Yan tomurcuklar, sürgün oluşturmak için farklı konsantrasyonlarda BA içeren MS ortamlarında kültüre alınmıştır. Tomurcuk başına en yüksek sayıda sürgün oluşumu, 2 mg/l BA içeren MS ortamından elde edilmiştir. Somatik embriyo oluşumunu sağlamak için, *in vitro*'da elde edilen sürgünlerden oluşan yapraklar eksplant olarak kullanılmıştır. Kalluslar, yaprakların farklı konsantrasyon ve oranlarda NAA ve BA içeren MS ortamlarında kültüre alınarak, yaprakların orta ve taban kısımlarından elde edilmiştir. En yüksek kallus oluşum oranı, yaprakların bazal kısımlarının 5 mg/l NAA içeren MS ortamında karanlık ortamda kültür edilmesi ile elde edilmiştir. Kremi beyaz renkte dağılgan kalluslar, 0.1 mg/l BA içeren MS ortamında ve aydınlık ortamda 4 hafta içerisinde çok sayıda somatik embriyo üretmişlerdir. İyi gelişen somatik embriyolar, 0.1 mg/l BA ve düşük düzeyde (20 mg/l) süktroz içeren MS ortamında çimlenmişlerdir. Bu ortamda somatik embriyoların %40'ı bitkiye dönüşmüştür. Soğan oluşumu ise aynı oranda BA ve 30 g/l süktroz içeren MS bazal ortamından sağlanmıştır.

Fritillaria imperialis nesli tükenmekte olan bir türdür ve dolayısı ile bu türün *in vitro* koşullarda mikro çoğaltımı, germplazm muhafazası ve ticari üretimi için büyük bir önem arz etmektedir. Bu nedenle **Mohammadi ve ark. (2007)**, *Fritillaria imperialis*'in taç yapraklarını farklı konsantrasyonlar içeren besi ortamlarında kültüre almışlardır. Ayrıca soğuk uygulaması ve ışığın kalluslar üzerinde somatik embriyo uyartım ve rejenerasyon oluşturmadaki etkisini ayrıntılı olarak incelemişlerdir. Soğuk uygulaması somatik embriyogenesis sürecine inhibe edici etki yaptığını saptamışlardır. Farklı kombinasyonlarda BAP, NAA ve IAA

içeren ortamlar test edilmiştir. Bu ortamlardan 0.1 mg/l BAP, 0.6 mg/l NAA ve 0.4 mg/l IAA içeren B5 ortamı, yumru üretimi için en iyi ortam olarak bulunmuştur.

Ptak ve Bach (2007) lalede somatik embriyogenesis için protokol geliştirmişlerdir. Somatik embriyogenesis düşük sıcaklık uygulaması süresince “Apeldoorn” çeşidinin yumrularından alınan çiçek sapları ile başlatılmıştır. Çalışmada, soğuklama yapılmayan ya da 12 ya da 24 hafta soğuklama yapılan soğanlar kullanılmıştır. Eksplantlar, 1-100 μ M konsantrasyonda oksinler (2,4-D, pikloram, NAA) ve 0.5–50 μ M konsantrasyonda sitokinler (BA ve zeatin) kullanılarak kültüre alınmıştır. Oksin konsantrasyonlarındaki artış, homojen renksiz kallusa dönüşen eksplant parankimasının yoğun şekilde genişlemesine neden olmuştur. Aynı ortamda, sarımsı nodüler kallusların içerisinde iletim demetleri oluşmuştur. Pikloram embriyogenik nodüler kallus oluşumunu uyardı, 2,4-D’den daha etkili olmuştur. Kallus oluşumu için 12 hafta boyunca soğuklamada bekletilmiş soğanlardan alınan çiçek sapının alt kısmının en iyi eksplant olduğu bildirilmiştir. En fazla somatik embriyo üretimi, 25 μ M Picloram ve 0.5 μ M BA’dan elde edilmiştir. Adventif köklerin gelişimi 2,4-D varlığında gerçekleştirilmiştir. Globular embriyolar, torpedo aşamasına 5 μ M BA ve 0.5 μ M NAA’nın etkisi ile dönüşmüştür.

Simoes ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada, *Cleome rosea* için somatik embriyogenesis aracılığı ile etkili bir vejetatif çoğaltım protokolü bildirmişlerdir. Fide olarak yetiştirilen *C. rosea*’ya ait yaprak ve gövde eksplantları IAA, NAA, pikloram ya da 2,4-D içeren MS ortamlarında kültüre alınmıştır. Nodüler kalluslar her iki eksplant tipinden de 4.5 ve 9.0 μ M 2,4-D’den elde edilmiştir. Gövde eksplantlarından elde edilen kalluslardan embriyo gelişimi ve olgunlaşması, kallusların başlangıçtaki 2,4-D konsantrasyonunun onda biri (0.45 and 0.90 μ M) kadar kullanıldığı ortamlarda başarılmıştır. Yaprak eksplantından oluşan kalluslar ise aynı uygulama ile embriyo oluşturmamıştır. En yüksek kallus oluşum frekansı (%85) ve kallus başına düşen embriyo sayısı (13.45 ± 2.8), 0.90 μ M 2,4-D içeren ortamda ilk alt kültür sırasında elde edilmiştir. Embriyoların bitkilere dönüşümü

hormon içermeyen MS ortamı içerisinde gerçekleştirilmiştir. Bitkilerin toprağa aktarılmasından üç ay sonra klimatizasyon oranı %53 olarak tespit edilmiş ve elde edilen bitkiler normal fenotipik özellik göstermiştir.

Yaacob ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada *Agapanthus praecox* ssp. *Minimus*'ta bir aylık steril fidelere ait kök, yaprak ve soğan eksplantlarını kullanarak etkili ve hızlı bir somatik embriyogenesis yöntemi rapor etmişlerdir. Yüksek bitki rejenerasyonu (%95) verebilen dağınık yapıdaki kalluslar, eksplantların pikloram, 2,4-D, TDZ ve NAA ile BAP'ın farklı kombinasyonlarını (0.5-2 mg/l) içeren MS ortamında, kültür başlangıcından itibaren 1-2 ay içerisinde verimli bir şekilde üretilmiştir. Daha sonra çoğaltılan kalluslar bol miktarda somatik embriyo üretimini uyartmak için 2 hafta aralıkla aynı içeriğe sahip besiyerlerine aktarılmıştır. Bu aşamadan sonra kalluslar tüm bitki rejenerasyonu için BBD içermeyen ortamlara aktarılmıştır. Analiz sonuçları, eksplant tipinin BBD uygulamasından yüksek oranda etkilendiğini göstermiş ve en iyi tepkiyi veren eksplant kök olmuştur. Pikloram, yaprak eksplantı üzerinde en iyi sonuçları verirken, 2,4-D kök ve soğan eksplantları üzerinde en iyi sonuçları vermiştir. Somatik embriyoların daha ileri gelişim aşamaları bazal MS ortamında gerçekleştirilmiştir. Rejenere olan bitkiler %86.7 hayatta kalma oranı ile dış ortama alıştırılmıştır. Taramalı elektron mikroskobu ile yapılan gözlemler *in vivo* ve *in vitro*'daki bitkiler arasında morfolojik farklılığın bulunmadığını göstermiştir.

Ploidi bazen bitkiler protoplast ve kallus kültürleri ile üretilince de oluşabilmektedir. Bu nedenle **Tomiczak ve ark. (2015)** *Gentiana decumbens* L.'te protoplast kültürü çalışmışlar ve çalışmada diploid *Gentiana decumbens* L.'e ait yeşil yaprak mezofil protoplastlarından bitkileri rejenere etmişlerdir. Genç yaprakların %1.0 (w/v) selüloz ve %0.5 (w/v) maserozim içeren enzim karışımı içerisinde inkübe edilmesiyle, gram başına 9x10⁵ adet protoplast, elde edilmiştir. Modifiye edilmiş MS ortamı kullanılarak agaroz taneleri içerisinde kültüre alınan protoplastlar, 2 mg/l NAA ve 1 mg/l TDZ içeren ortamda mikrokallusları

oluşturmuştur. Flow sitometrik analizler ve kromozom sayımı tüm rejenerantların tetraploid olduğunu göstermiştir.

Baskaran ve Staden (2017) *Lachenalia montana* Schltr. ex W.F. Barker'in yaprak eksplantlarından hücre kültürü ile embriyogenesi, dağılgan embriyojenik kallus (DEK) kullanarak ilk defa gerçekleştirmişlerdir. DEK kültürleri farklı konsantrasyon ve kombinasyon içeren sükroz ve BBD içeren MS ortamlarında kurulmuştur. Somatik embriyolar BBD içeren ya da içermeyen sıvı kültür içerisindeki DEK'lerden elde edilmiştir. Daha fazla sayıda, farklı gelişim aşamalarındaki (globular safhasından kotiledon safhasına kadar) embriyolar 0.5 μ M 2,4-D ve 1 μ M TDZ içeren sıvı MS ortamından elde edilmiştir. Çimlenme frekansı (%33.7), 1 μ M 2,4-D ve 2 μ M TDZ içeren sıvı MS ortamında en yüksek bulunmuştur. Farklı aşamalardaki somatik embriyolar (%92) 15 g/l sükroz ve floroglusol içeren katı MS ortamında çimlenmiştir. Bitkiler sera koşullarında başarılı bir şekilde dış ortama alıştırılmıştır.

Petric ve ark. (2017) *Fritillaria meleagris* L.'de somatik embriyogenesinin erken aşamalarındaki esteraz ve peroksidaz enzimatik profilini belirlemişlerdir. Somatik embriyogenesi, 2,4-D içeren ortamda yaprak tabanı eksplantı kullanılarak uyartılmıştır. Zimografi, kontrol eksplantları ile karşılaştırıldığında morfogenez sırasında farklı izoform ve peroksidaz olmak üzere farklı parçaların mevcut olduğunu göstermiştir. Bir izoform esterazı sadece somatik embriyogenesi esnasında, bir izoform da kontrol eksplantlarında tespit edilmiştir. 1-naftalin bütirat ile yapılan analizler *F. meleagris*'te somatik embriyogenesise katılan esterazların, aril esteraz ailesine ait olduğunu göstermiştir. *F. meleagris*'in morfogenezinde yer alan beş esteraz izoformunun, aril esteraz ailesinde yer alırken, iki izoformun karboksil esterazlardan olduğu ilk kez kanıtlanmıştır.

Shen ve ark. (2018) *Tolumnia* Louise Elmore 'Elsa'da yaptıkları somatik embriyogenesi çalışmasında eksplant olarak *in vitro* koşullarda yetişen bitkilerin yapraklarını kullanmışlardır. Çalışmada direk somatik embriyogenesi uyarmak için 0.3, 1 ve 3 mg/l konsantrasyonlarda beş farklı sitokinin (2iP, BA, Kinetin,

TDZ ve zeatin) içeren ½ MS besisi ortamı kullanılmıştır ve karanlıkta kültüre alınmıştır. Doksan günlük kültür sonrasında 3 mg/l TDZ içeren ortamdan en fazla oranda somatik globular embriyo elde edilmiştir. Işık rejiminin ve 2,4-D'nin direk somatik embriyogenesi yüksek oranda geciktirdiği ve %95-100 oranında kahverengileşmenin olduğu bildirilmiştir. Histolojik gözlemler, yaprak hücrelerinin önce meristematik hücrelere, ardından somatik proembriyolara ve daha sonra somatik küresel embriyolara bölündüğünü göstermiştir. En son aşamada somatik embriyolar, sürgün ve kök meristemini içeren bipolar yapıya dönüşmüştür. Taramalı elektron mikroskopu gözlemleri, yaprak eksplantlarından direkt somatik embriyogenesinin eş zamanlı olmadığını göstermiştir. Somatik embriyolar, yaprağın uç kısmında, üst yüzeyinde ve bir çatlak boyunca mezofil kısmında oluşmuştur ve eksplantın heterojenitesini yansıtmıştır. Doksan günlük globular embriyolar, ana dokudan alınarak hormon içermeyen ½ MS besisi ortamına aktarılmışlar ve ışıklı ortamda 1 cm uzunluğunda bitkileri oluşturma kadar 1 ay süre ile kültüre alınmışlardır. Sonraki üç ay boyunca bitkicikler spagnum yosunu ile saksılanmışlar ve gölgelendirilmiş sera içerisinde klimatize edilmişlerdir. Bir ay sonraki hayatta kalma oranının %100 olduğu bildirilmiştir.

2.4. Sentetik Tohum Çalışmaları

Winkelmann ve ark. (2004) *Cyclamen persicum*'da yaptıkları çalışmada sıvı kültürde ürettikleri embriyolardan sentetik tohum üretmişlerdir. Bu çalışmada, globular embriyolar kullanılarak klasik aljinat ile kaplama ve oluklu tanecik sentetik tohumlar olmak üzere iki farklı kapsülasyon sistemi denenmiştir. Aljinat tanelerindeki çimlenme oranları kaplama yapılmamış kontrol embriyoları kadar yüksek (%97) bulunmuş, ancak çimlenme daha geç olmuştur. Oluklu taneciklerde ise çimlenme oranı %71 olarak tespit edilmiş ve çimlenme daha geç olmuştur. Oluklu taneciklerde çimlenme kapsül içerisinde olmuştur ve kapsül dışına çıkış aljinat kapsüllerindekilere göre daha zor olmuştur. Dört hafta boyunca 4°C'de

depolama hem kontrol grubunda hem de kapsüllenmiş embriyolarda canlılığın azalmasına sebep olmuştur.

Seyring ve Hohe (2005) *Cyclamen persicum* Mill'de sentetik tohumların geliştirilmesi için yaptıkları çalışmada, *C. persicum*'a ait somatik embriyoların kuruma toleransının uyarılması için çeşitli prosedürleri test etmişlerdir. Morfolojik özelliklere göre olgun embriyoların dikkatli bir şekilde seçilmesinin en önemli etken olduğu bildirilmiştir. En yüksek çimlenme oranı, kuru ağırlığın her bir gramında 0,2 gr H₂O içeren 700-1000 µm boyutlarındaki torpedo şeklindeki somatik embriyolardan elde edilmiştir. Olgunlaşma besiyerine, 75 g/l polietilen glikol ve 10 mg/l absisik asit eklenmesi kuruduktan sonra somatik embriyoların çimlenme oranını %28'e (uygulama yapılmayan kontrol grubunda %4) kadar çıkarmıştır.

Mohanty ve ark. (2013) Çin'de tıbbi aromatik olarak önemli bir kullanım alanı olan *Dendrobium nobile*'de protokorm benzeri yapıların farklı ozmotik maddeler (sükroz ve mannitol) kullanılarak kısa süreli muhafazasını araştırmışlardır. Kapsülleme maddesine düşük sükroz ve mannitolün (% 3 ve % 5) eklenmesi durumunda, kontrol grubu ile neredeyse aynı sonuçlar elde edilmiştir. Bütün uygulamalarda protokorm benzeri yapıların yarıdan fazlası kapsül dışına çıkmıştır. Ancak kapsül matrisinin %7.7 ile %12.5'e çıkarılması durumunda kapsül dışına çıkış 60. güne kadar depolamada bile gerçekleşmemiştir.

Haque ve Ghosh (2014) *Drimiopsis kirkii*'de indirek somatik embriyogenesis yöntemi ile etkili bir rejenerasyon protokolü geliştirmişlerdir. Bu protokolü kullanarak elde ettikleri embriyoları kalsiyum aljinat ile kaplamışlardır ve depolama potansiyellerini araştırmışlardır. En yüksek sentetik tohum çimlenme oranı, %93.3 ile %1 sodyum aljinat ile kaplanan sentetik tohumlardan elde edilirken, bunu %86.7'lik oranla %2.5 sodyum aljinat ile kaplı sentetik tohumlar takip etmiştir. Sentetik tohumlar 4, 15 ve 24°C olmak üzere üç farklı sıcaklıkta 6 aya kadar depo edilmişlerdir. Farklı sıcaklıklarda muhafaza edilen sentetik tohumlardan, 15 °C'de 4 ay sonra %64.4 çimlenebilirlik görülmüştür. Hem

kapsüllenmemiş hem de kapsüllenmiş embriyolar başarılı bir şekilde toprağa aktarılmış ve sırası ile %93.3 ve %83.3'lük hayatta kalma oranları göstermişlerdir. RAPD analizleri sonucunda bitkiciklerde herhangi bir varyasyonun olmadığı saptanmıştır.

Mahendran (2014) yaptığı çalışmada, *Cymbidium bicolor* Lindl.'da 60 günlük tohum kültürlerinden elde ettiği protokormları çoğaltım ve kısa süreli muhafaza için kapsüle almıştır. Farklı konsantrasyonlarda jel maddesi (sodyum aljinat) ve katılaştırıcı (kalsiyum klorit), üniform tane oluşumu için test edilmiştir. İdeal tane, %3 sodyum aljinat ve 100 mM kalsiyum klorit kullanılarak elde edilmiştir. Protokormlar en yüksek dönüşüm oranını 4.42 μ M BA içeren MS ortamında göstermişlerdir. Kapsüllenmiş protokormlar, 25°C'de muhafaza edildiklerinde yeşil renklerini ve canlılıklarını korumuşlar ve 365 gün sonra bile çimlenebilmişlerdir. Protokormlar, 4°C'de muhafaza edildiklerinde ise 30. güne kadar canlılıklarını muhafaza etmişler ve daha sonrasında ise dönüşüm oranları ani bir şekilde düşmüştür. İyi gelişmiş bitkicikler, vermikülit içeren plastik saksılara ekilmiş ve iklimlendirme için kültür odasında 60 gün bekletilmişlerdir. Bitkilerin %90'ı başarılı bir şekilde toprağa aktarılmıştır.

Yücesan ve ark. (2014) *Muscari armeniacum*'da farklı konsantrasyonlarda BA (0.5, 1.0 veya 2.0 mg/l) ve 0.5 mg/l NAA içeren LS ortamından etkili bir rejenerasyon protokolü geliştirmişlerdir. En yüksek direk somatik embriyo oluşumu, 10 hafta sonra eksplant başına ortalama 7.9 embriyo ile 2.0 mg/l BA ve 0.5 mg/l NAA içeren LS ortamından elde edilmiştir. Olgunlaşmamış soğanlar, sodyum aljinat ile kaplanarak ya da doğrudan 0.5-1 mg/l GA₃ içeren ya da içermeyen LS ortamlarına 6 haftalığına aktarılmıştır. Kapsüllenmiş soğanlar, 4 °C'de karanlıkta 10 hafta süre ile muhafaza edilmiş ve neredeyse tüm soğanlar canlılıklarını korumuştur.

Stella ve ark. (2015) hormon içeren ve içermeyen MS ortamlarında bir orkide türü olan *Spathoglottis plicata* blume tohumlarının rejenerasyon

potansiyellerini test etmişlerdir. Elde ettikleri protokorm benzeri yapıları, %3 sodyum aljinat ile kaplamışlardır.

Bektaş ve Sökmen (2016) *Serapias vomeracea*'da TDZ'nin farklı konsantrasyonlarını (0.1, 0.25, 0.5, 1.0, ve 2.0 mg/l) ve 1.0 mg/l IBA içeren Orchimax ortamı kullanarak protokorm benzeri yapıları elde etmişlerdir. Sentetik tohum üretimi için %3 sodyum aljinat ve 75 mM kalsiyum klorür kullanmışlardır. Yapay endosperm olarak aktif karbon içermeyen BBD olarak 2 mg/l Zeatin ve 1 mg/l IBA içeren Orchimax ortamı kullanmışlardır. Sentetik tohumların çimlendirilmesini *in vitro* ve steril toprakta gerçekleştirmişlerdir. *In vitro* da çimlenme oranı, %80 olarak elde edilirken, toprak koşullarında bu oran %75 olarak hesaplanmıştır.

Baskaran ve ark. (2017) *Urginea altissima*'da yaprak ya da uzunlamasına ince hücre tabakalarından muhafaza ve ticari çoğaltım yapmak amacı ile organogenesis ve sentetik tohum protokolünü geliştirmişlerdir. *In vitro* rejenerasyonunu sağlamak için farklı bitki büyüme düzenleyiciler ve floriglusinol içeren yarı katı ve sıvı MS ortamları kullanılmıştır. Uygulamalar arasında en yüksek sürgün oluşumu (eksplant başına 17.4) 10 µM meta-Topolin (mT) ve 2 µM benziladenin içeren sıvı MS ortamından sonra yarı katı MS ortama aktarılan kültürlerden elde edilmiştir. Sürgün uçları, %3 sodyum aljinat ve 100 mM kalsiyum klorit içeren MS ortamı ile kaplanmıştır. Sentetik tohumlardan adventif sürgün oluşumu (% 91.0; sentetik tohum başına 12.6 sürgün), karanlıkta ve 25 ± 2°C'de 15 gün saklandıktan sonra 10 uM mT ve 2 µM NAA içeren yarı katı MS ortamından elde edilmiştir. Sürgün uçları, 5 µM IBA ve 2,5 µM NAA içeren ortamlara aktarıldığında köklenme sağlanmıştır. Tüm bitkiler serada 1/1 oranında karıştırılmış vermikulit/toprak karışımında %100 oranında aklimitize edilmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

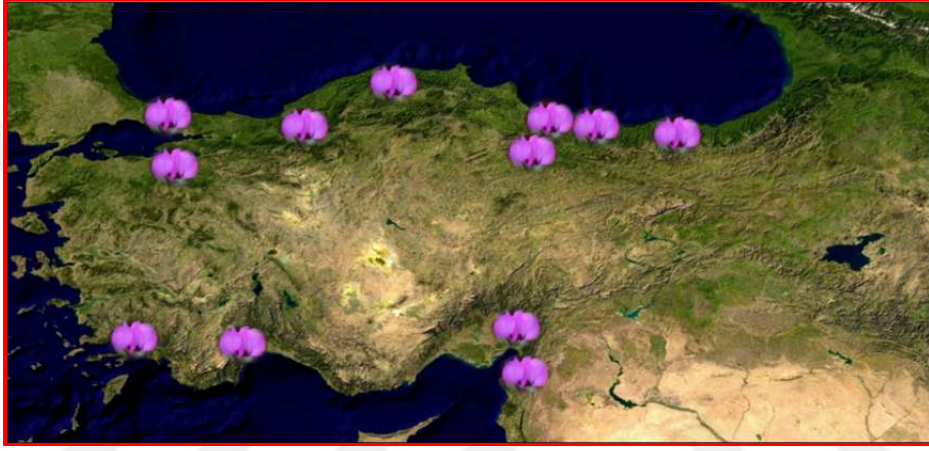
3.1. Bitkisel Materyal

Tez çalışmasında bitkisel materyal olarak *Cyclamen coum* türü kullanılmıştır. *C. coum*'a ait bitkiler daha önceden TÜBİTAK 110O102 no'lu proje kapsamında doğadan toplanmış ve Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü Süs Bitkileri serasında kültüre alınmıştır. Bitkiler eşit miktarda torf, perlit ve kum karışımı içerisinde 3 litrelik plastik saksılarda yetiştirilmiştir. Vejetasyon süreci boyunca bitkilere haftada bir, saksı başına 300 ml olacak şekilde musluk suyu ile sulama işlemi yapılmıştır. İki ayda bir %2'lik N: P: K (18-6-26) gübrelemesi yapılmıştır. Tezgah üzerinde yetiştirilen bitkilerin üzerine koyu yeşil netler çekilerek güneş ışınlarından zarar görmeleri engellenmiştir. Tez kapsamında kullanılan *C. coum* türüne ait bitkiler, Trabzon ilinden iki farklı lokasyonda toplanmıştır. İlk lokasyonun koordinatları 40°37.062'K, 40°17.983'D 1118m rakım, ikinci lokasyonun koordinatları ise 40°36.298'K, 40°19.027'D 1146m rakımdır.

3.1.1. *Cyclamen coum* var. *coum*

Tez çalışmasında kullanılan tür, iki ana yayılış alanına sahiptir. Bu yayılış alanlarından ilki Kafkasya, Kırım ve Türkiye'de Karadeniz'i çevreleyen dağlardan Bulgaristan'da Tuna nehrinin güneyine doğru uzanan kısımları içine alır. İkinci alan ise Akdeniz'in kuzeydoğusundaki dağlardan, İsrail'e kadar uzanan alanı kapsamaktadır. Ülkemizde ise Toros Dağları, Amanos Dağlarında ve Karadeniz Bölgesi'nde yetişmektedir (Şekil 3.1). *C. coum*, deniz seviyesinden 2100 m'ye kadar olan yüksekliklerde yetişmektedir. Humusça zengin topraklarda, iğne yapraklı ağaçların bulunduğu ormanlıklarda, çalılık ya da bodur ağaçlarla kaplı nemli bölgelerde veya nemli kayalıklarda yayılış göstermektedir. Soğuklara karşı dayanıklı olması ile ön plana çıkan bu tür, dış mekan süs bitkisi olarak önemli bir potansiyele sahiptir. Kromozom sayısı $2n=30$ olarak bilinmektedir. Yumruları 5 cm'ye kadar ulaşabilmektedir, yapraklar geniş kalp şeklinde ve uzunlukları 2-8 cm

arasında, yaprak çapı ise 2-3 cm çapında olmaktadır. Ayrıca yapraklarda türe bağlı olmaksızın oldukça parlak, koyu yeşil veya gri yeşil ve yapraklarda beyaz lekeler bulunmaktadır. Taç yapraklar, açık veya koyu kırmızı pembe renktedir. Beyaz renkte taç yapraklar, oldukça nadiren görülmektedir (Şekil 3.2). Çiçeklenme, Şubat-Mayıs aylarında gerçekleşmektedir (Sevindik, 2018; Sarıjlu, 2016).



Şekil 3.1. *Cyclamen coum*'un Türkiye'deki yayılış alanı



Şekil 3.2. Doğal yayılış gösteren *C. coum* türü (Mendi ve Çürük 2016)

3.2 Metot

Tez çalışmasının *in vitro* denemelerinin bir kısmı ve bitkilerin kültürel bakım işlemleri, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarı ve süs bitkileri serasında 2016-2018 yılları arasında gerçekleştirilmiştir. *In vitro* denemelerin diğer kısmı ve elde edilen bitkilerin dış ortama alıştırılması, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Doku Kültürü Laboratuvarı ve alıştırma serasında 2018-2019 yılları arasında gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. Eksplantların Yüzeysel Sterilizasyonu

In vitro denemeler için kullanılacak eksplantlar (yaprak ve yaprak sapı), sağlıklı durumda olan (hastalık ya da zararlı bulundurmeyen) bitkilerden seçilmiş ve orta büyüklükteki yapraklar, sapları ile birlikte alınmıştır. Yaprak ve yaprak sapları birbirlerinden ayrılarak ayrı kaplar içerisine konulmuştur. İlk olarak Koçak ve ark. (2014)'nın *C. persicum* için bildirmiş oldukları sterilizasyon yöntemi denenmiştir. Tekrar eden denemelerde Çizelge 3.1'de verilen sterilizasyon denemeleri kurulmuştur. Sterilizasyon işleminin aşamaları Şekil 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.1. Kurulan sterilizasyon denemeleri

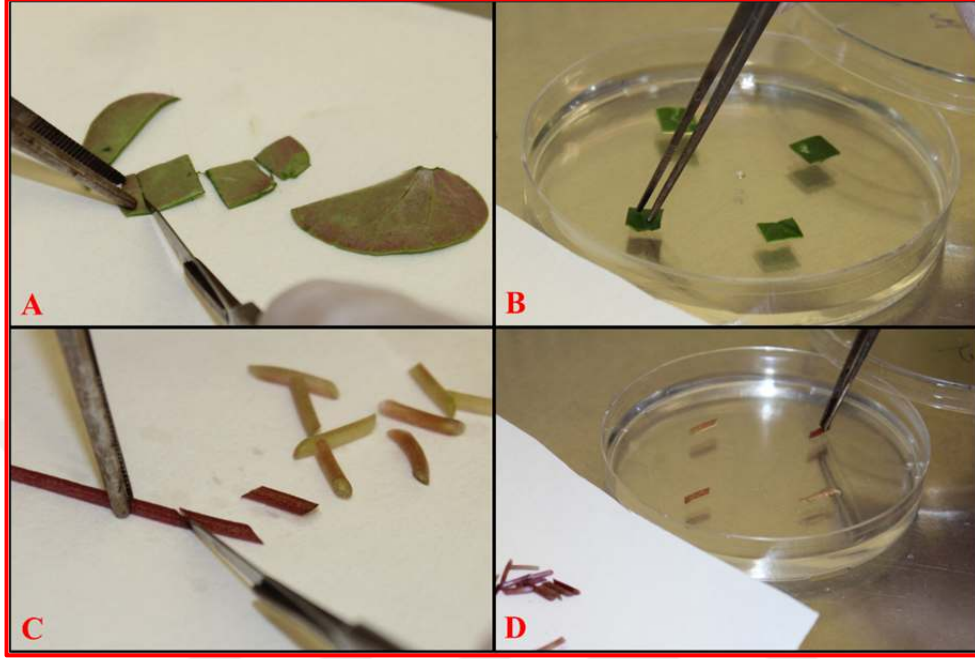
	Uygulanan işlem	Uygulama dozu	Uygulama süresi
1. Sterilizasyon denemesi	Antibakteriyel sıvı sabunla yıkama		
	Musluk suyu altında bekletme	---	20 dakika
	HgCl ₂ 'de bekletme	% 0,1	30 dakika
	Saf su ile durulama		
	Etil alkolde bekletme	% 70	1.5 dakika
	Steril saf su ile durulama		
	Domestos®'da bekletme	% 30	30 dakika
	Steril saf su ile durulama		
2. Sterilizasyon denemesi	Antibakteriyel sıvı sabunla yıkama		
	Musluk suyu altında bekletme	---	20 dakika
	HgCl ₂ 'de bekletme	% 0,1	25 dakika
	Saf su ile durulama		
	Etil alkolde bekletme	% 70	1.5 dakika
	Steril saf su ile durulama		
	Domestos®'da bekletme	% 30	25 dakika
	Steril saf su ile durulama		



Şekil 3.3. Yaprak ve yaprak sapı eksplantlarının sterilizasyonu A) Eksplantların antibakteriyel sıvı sabun ile yıkanması, B) Eksplantların çeşme suyu altında bekletilmesi, C) Eksplantların % HgCl_2 'de bekletilmesi, D) Eksplantların Domestos®'da bekletilmesi.

3.2.2. Eksplantların Hazırlanması ve Kallus Geliştirme Kültürü

Eksplantlar sterilizasyon işlemi sonrası steril pens ve bistüri kullanılarak küçük parçalara bölünmüş ve besi ortamlarına aktarılmıştır (Şekil 3.4). *C. coum* türünde embriyojenik kallusların elde edilmesi için yaprak ve yaprak sapı eksplantları kullanılarak farklı deneyler kurulmuştur. Bu deneyler maddeler halinde verilmiştir. Kurulan bütün deneylerde besi ortamı olarak MS kullanılmıştır. MS besiyeri içeriği Çizelge 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.4. Eksplantların hazırlanması ve besi ortamlarına aktarılması A) Yaprak eksplantlarının hazırlanması, B) Yaprak eksplantlarının besi ortamına aktarılması, C) Yaprak sapı eksplantlarının hazırlanması, D) Yaprak sapı eksplantlarının besi ortamına aktarılması

Çizelge 3.2. Tez çalışmasında kullanılan MS besi yeri içeriği

Makro elementler (MS)	(mg/l)
NH ₄ NO ₃	825
KNO ₃	950
CaCl ₂ x 2H ₂ O	220
MgSO ₄ x 7H ₂ O	185
KH ₂ PO ₄	85
Mikro elementler (MS)	(mg/l)
H ₃ BO ₃	3.1
MnSO ₄ x 1H ₂ O	8.45
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	5.3
KI	0.415
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0.125
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0.0125
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0.0125

3.2.2.1. Deneme I

Bu denemede ½ MS besi ortamı ve diğer komponentler kullanılmıştır (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Denemelerde kullanılan besi yeri ve diğer komponentler

İçerik	Miktar (1 litre için)
MS (Basal)	2.2 g
MS Vitamin	500 µl
FeEDTA	5 ml
Pepton	250 mg
Sükroz	30 g
Glukoz	2 g
Myoinositol	0.05 g
B.B.D.	Değişken (Çizelge 3.3)
pH	5.7
Gelrite	3 g

Bitki büyüme düzenleyici olarak NAA, BA ve Kinetinin farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarından oluşan 24 farklı ortam kullanılmıştır (Çizelge 3.4). Denemede genotip etkisini ortadan kaldırmak için farklı genotiplerden (Şekil 3.5) alınan eksplantlar, her petriye 4'er adet konularak ve her bir eksplant için her ortamdan 20 adet petri ile deneme kurulmuştur. Denemede kullanılan tüm ortamlara her bitkiden eksplant alınarak aktarılmıştır. Ortamlara aktarılan eksplantlar tamamen karanlık ortamda ve 24 °C'de kültüre alınmıştır. Alt kültür işlemi her 4 haftada bir düzenli olarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.4. Deneme I’de kullanılan farklı BBD konsantrasyon ve kombinasyonları

Ortam No	NAA (mg/l)	BA(mg/l)
Kontrol	0	0
1	1	0.5
2	1	1
3	1	1.5
4	1	2
5	2	0.5
6	2	1
7	2	1.5
8	2	2
9	2.5	0.5
10	2.5	1
11	2.5	1.5
12	2.5	2
Ortam No	NAA (mg/l)	Kinetin (mg/l)
13	1	0.5
14	1	1
15	1	1.5
16	1	2
17	2	0.5
18	2	1
19	2	1.5
20	2	2
21	2.5	0.5
22	2.5	1
23	2.5	1.5
24	2.5	2



Şekil 3.5. Deneme I’de kullanılan genotipler

3.2.2.2. Deneme II

Deneme II’de Winkelmann (2010)’nın *C. persicum* için bildirdiği protokol kullanılmıştır. Bu protokole göre ortam olarak ½ MS besiyeri ve BBD olarak 2 mg/l 2,4-D ve 0,8 mg/l 2iP kullanılmıştır. Diğer komponentler, Çizelge 3.2’de verildiği gibidir. Deneme petri başına 4 eksplant olacak şekilde kurulmuştur (Çizelge 3.5). Eksplantlar tamamen karanlık ortamda ve 24 °C’de kültüre alınmıştır.

Çizelge 3.5. Deneme II’nin deneme planı

Besî ortamı ve BBD	Bitki no	Petri sayısı		Toplam (Petri)
		Yaprak	Yaprak sapı	
½ MS 2 mg/l 2,4-D 0,8 mg/l 2iP	TCC-26	15 petri (her petride 4 eksplant)	15 petri (her petride 4 eksplant)	30
	TCC-56	15 petri (her petride 4 eksplant)	15 petri (her petride 4 eksplant)	30
	TCC-10	15 petri (her petride 4 eksplant)	15 petri (her petride 4 eksplant)	30
	TCC-16	15 petri (her petride 4 eksplant)	15 petri (her petride 4 eksplant)	30
	TCC-4	15 petri (her petride 4 eksplant)	15 petri (her petride 4 eksplant)	30
	Toplam (Petri)	75	75	150

3.2.2.3. Deneme III

Deneme III’de Winkelmann ve ark. (2010)’nın *C. persicum* için geliştirdiği protokolün iki farklı modifiye edilmiş hali kullanılmıştır. İlk ortamda (M1), kullanılan BBD konsantrasyonları yarıya düşürülmüştür (1 mg/l 2,4-D + 0,4 mg/l 2-iP) diğer ortamda (M2) ise ½ MS yerine tam miktar MS kullanılmıştır (Çizelge 3.6). Deneme petri başına 4 eksplant gelecek şekilde kurulmuş ve eksplantlar tamamen karanlık ortamda ve 24 °C’de kültüre alınmıştır.

Çizelge 3.6. Deneme III’ün deneme planı

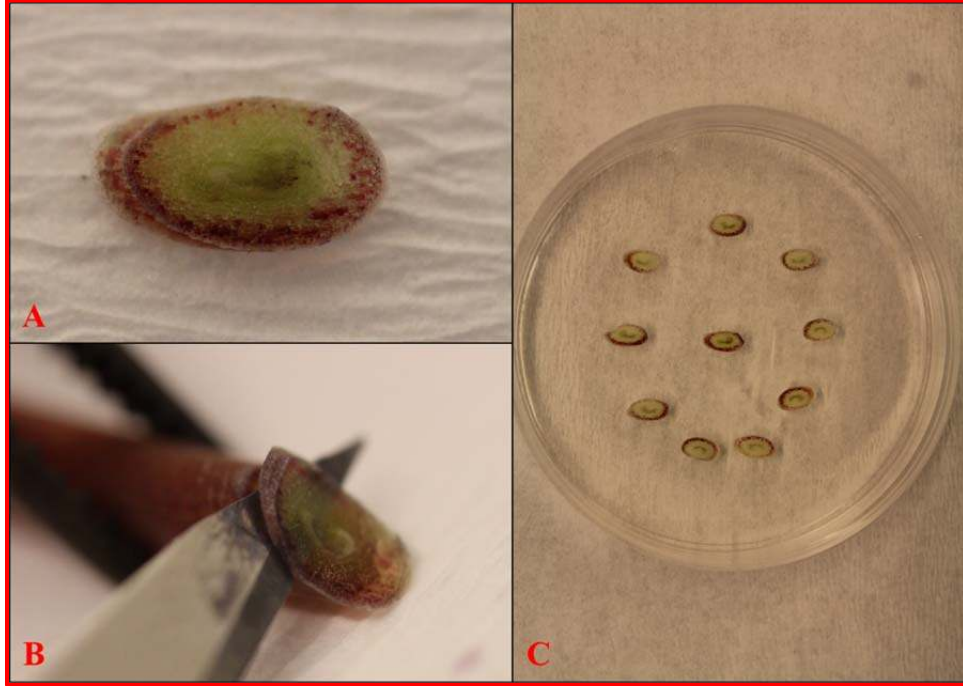
Besî ortamı ve BBD	Bitki no	Petri sayısı		Toplam (Petri)
		Yaprak	Yaprak sapı	
(M1) ½ MS 1 mg/l 2,4-D 0,4 mg/l 2IP	TCC-4	15 petri (her petride 4 eksplant)	15 petri (her petride 4 eksplant)	30
	TCC-56	15 petri (her petride 4 eksplant)	15 petri (her petride 4 eksplant)	30
	TCC-47	15 petri (her petride 4 eksplant)	15 petri (her petride 4 eksplant)	30
(M2) Full MS 2 mg/l 2,4-D 0,8 mg/l 2IP	TCC-29	15 petri (her petride 4 eksplant)	15 petri (her petride 4 eksplant)	30
	TCC-20	15 petri (her petride 4 eksplant)	15 petri (her petride 4 eksplant)	30
	TCC-11	15 petri (her petride 4 eksplant)	15 petri (her petride 4 eksplant)	30
Toplam (Petri)		90	90	180

3.2.2.4. Deneme IV

Bu denemede eksplantlar 1 ay boyunca 4°C’de soğuk uygulamasına maruz bırakılmıştır. BBD olarak NAA ve BA’nın farklı konsantrasyonları (Çizelge 3.3’te verilen 1-12 nolu ortamlar) kullanılmıştır. Soğuk uygulamasının ardından eksplantlar diğer denemelerde olduğu gibi tamamen karanlık ortamda ve 24 °C’de kültüre alınmıştır.

3.2.2.5. Deneme V

Yaprak sapları, oval şekilde ince diskler halinde kesilerek 6 cm’lik petri kaplarındaki besi ortamlarına aktarılmıştır (Şekil 3.6). Her petriye 10’ar adet eksplant konulmuştur. Ortam olarak 6, 8, 18 ve 20 (Çizelge 3.3) numaralı ortamlar kullanılmıştır. Eksplantlar tamamen karanlık ortamda ve 24 °C’de kültüre alınmıştır.



Şekil 3.6. Eksplantın hazırlanması A)Yaprak saplarının ince oval diskler şeklinde kesilmesi, B) kesilmiş halde yaprak sapı diski, C) Eksplantların ortamlara aktarılması

3.2.2.6. Deneme VI

Donör bitki olarak, *in vitro*'da rejenerasyon sonucu elde edilen bitkiler kullanılmıştır (Şekil 3.7). Bu bitkilerden alınan yaprak ve yaprak sapları 6, 8, 18 ve 20 numaralı (Çizelge 3.3) ortamlarda kültüre alınmıştır. Kültür şartları diğer denemelerde olduğu gibi tamamen karanlık ortamda ve 24 °C'de gerçekleştirilmiştir. Deneme her petriye 3 eksplant konularak kurulmuştur.



Şekil 3.7. Deneme VI'da kullanılan *in vitro* koşullarda somatik embriyogenesis ile elde edilmiş bitkiler

Bütün denemelerde kallus oluşturma ortamında eksplantlar 8 hafta süre ile kültüre alınmıştır. Sekiz hafta sonunda kallus oluşturan eksplantlar farklılaştırma ortamına aktarılmıştır.

3.2.3. Farklılaşma ve Somatik Embriyoların Çimlenmesi

Kallus uyartım ortamlarından elde edilen kalluslar farklılaşarak somatik embriyoları oluşturmaları ve somatik embriyoların çimlenmeleri için kallus uyartım ortamı ile aynı içeriğe sahip olan ancak BBD içermeyen ortamlara aktarılmıştır. Bu

ortamda eksplantlar, 4 haftada bir düzenli olarak alt kültüre alınmıştır. Kültür işlemi 24 °C’de ve embriyolar çimlenene kadar tamamen karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir. Embriyojenik kallusların farklılaşması sonucu oluşan embriyolar farklı petrilere aktararak bireysel olarak kültüre alınmıştır. Çimlenmeye başlayan (kotiledon yaprak oluşturan) embriyolar karanlık ortamdan aydınlık ortama aktarılmıştır. Çimlenme işlemini tamamlayıp birkaç yaprak oluşturan bitkicikler petrilere alınarak daha büyük yetiştirme kaplarına aktararak kültüre devam edilmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Petride çimlenen ve sonraki aşamada bireysel olarak kültüre alınan bitkicikler

Çimlenen embriyolarda yeni yaprakların oluşumunu teşvik etmek amacı ile farklılaştırma ortamına BA ve sitokinin eklenerek üç farklı ortam ile bir deneme kurulmuştur. İlk ortam, 0.5 mg/l BA, ikinci ortam 0.5 mg/ Kinetin, üçüncü ortam ise 0.5 mg/l BA ve 0.5 mg/l Kinetin içermektedir.



Şekil 3.9. Bireysel olarak geliştirme kaplarında kültüre alınan bitkicikler

3.2.4. Somatik Embriyoların Elektron Mikroskopu (SEM) ile İncelenmesi

Elde edilen embriyoların farklı gelişim aşamaları taramalı elektron mikroskopu altında fotoğrafları çekilerek incelenmiştir. Farklı gelişim aşamalarındaki embriyolar, mikroskop altında seçilerek alınmıştır. Taramalı elektron mikroskopunda incelemeye önce örnekler kurutma işleminden geçirilmiştir. Örnekler ilk olarak fiksasyon amacı ile 50 ml Formaldehit, 50 ml Propiyonik asit ve 900 ml %70'lik etil alkol içeren FPA 70 fiksasyon sıvısı içerisinde 1 gün boyunca bekletilmiştir. FPA 70 çözeltisinde bekletilerek fikse edilen örnekler daha sonra alkol seviyeleri artan Johansen karışım serileri içerisinde bekletilmiştir (Şekil 3.10). Daha sonra saf tersiyer bütül alkol (TBA) ile muamele edilen örnekler etüvde bekletilerek kurutma işlemi tamamlanmıştır. Uygulanan kurutma protokolü Çizelge 3.7'de verilmiştir. Kurutulan örnekler SEM analizi yapılmadan önce altın paladyum ile kaplandıktan (Şekil 3.11) sonra FEI Quanta 650 Field Emission SEM ile 20 kV'da incelenmiştir (Şekil 3.12).



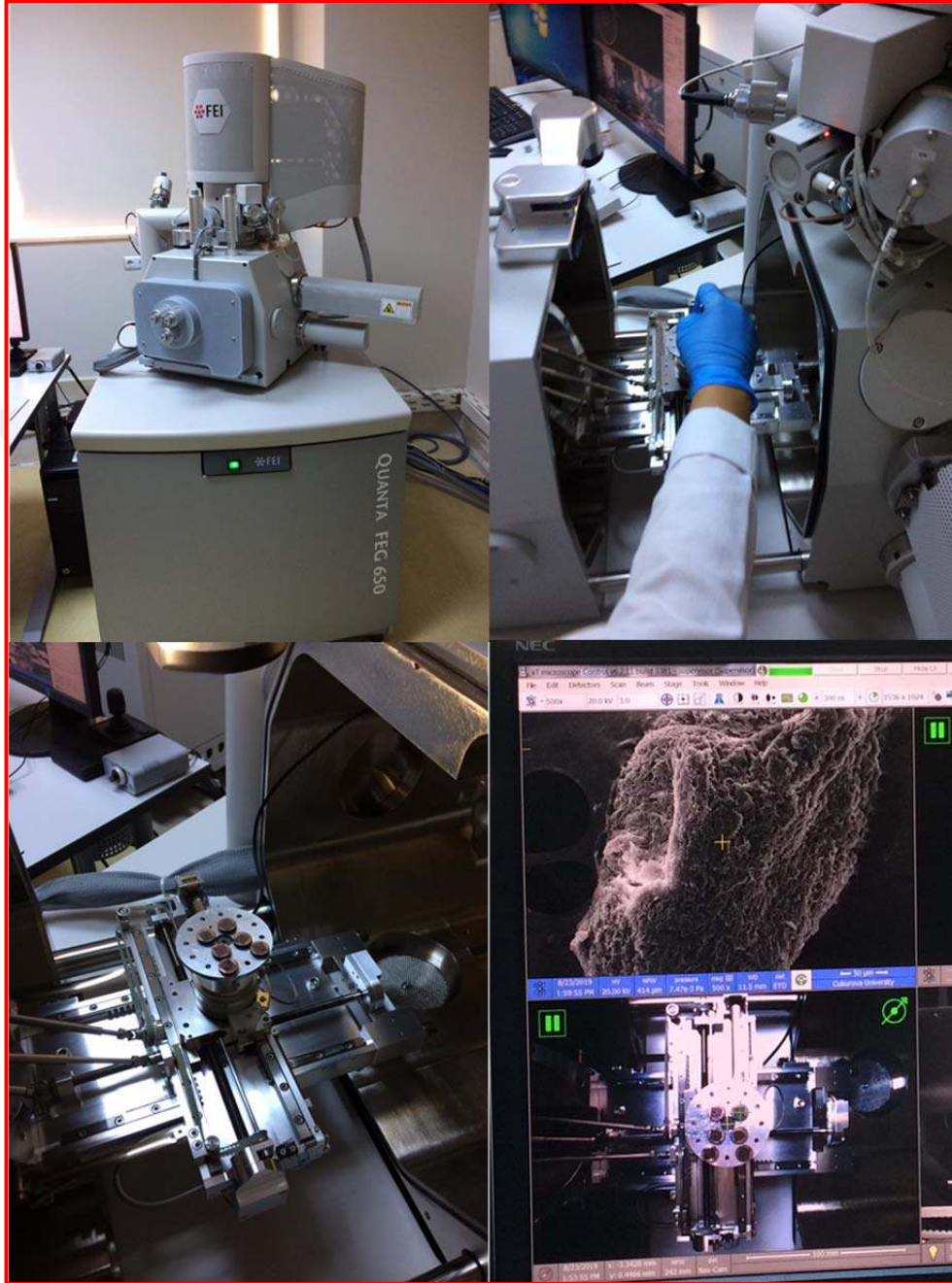
Şekil 3.10. Embriyo örneklerinin Johansen çözeltileri içerisinde bekletilmesi

Çizelge 3.7. Embriyo örneklerinin kurutulmasında uygulanan protokol

	İçerik	Uygulama süresi	Uygulama şekli
FPA 70	50 ml formaldehit, 50 ml Propiyonik asit, 900 ml %70'lik etil alkol	1 gün	10 saat oda sıcaklığında, saatte bir hafifçe çalkalama. Geri kalan sürede +4°C'de bekletme
%85'lik Johansen	150 ml saf su, 500 ml etil alkol, 350 ml TBA	3 saat	Oda sıcaklığında
%95'lik Johansen	450 ml etil alkol, 550 ml TBA	3 saat	Oda sıcaklığında
%100'lük Johansen	200 ml etil alkol, 800 ml TBA	3 saat	Oda sıcaklığında
Tersiyer bütül alkol (TBA)	Saf	3 saat (2 kez)	Oda sıcaklığında
Etüv		5 saat	40 °C'de



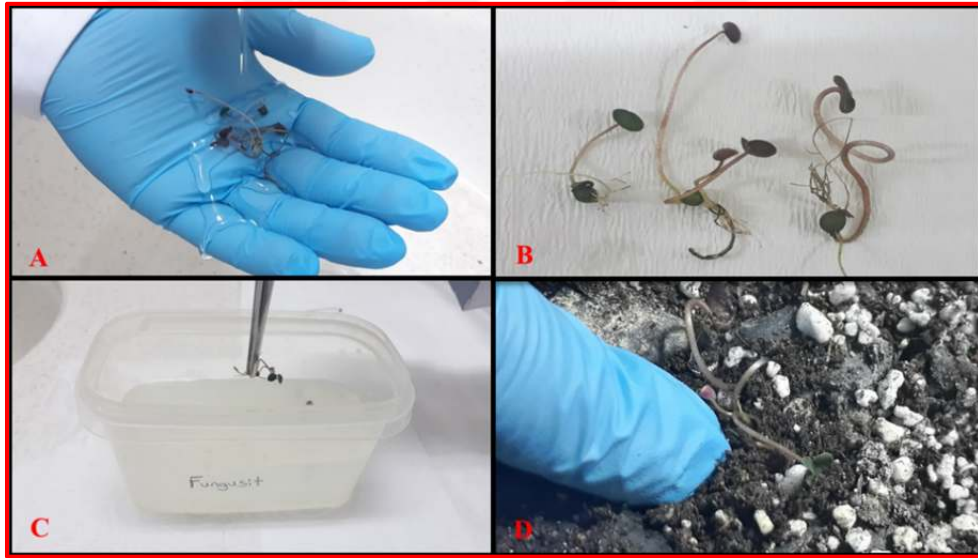
Şekil 3.11. Embriyo örneklerinin altın paladyum ile kaplanması.



Şekil 3.12. Embriyo örneklerinin FEI Quanta 650 Field Emission SEM ile analiz edilmesi

3.2.5. Bitkiciklerin Dış Ortama Aktarılması

BBD içermeyen ortamlarda kültüre alınan embriyolar çimlenerek yumru, kök ve yaprak kısımlarını oluşturduktan sonra dış ortama aktarım işlemleri gerçekleştirilmiştir. Dış ortama aktarılacak büyüklüğe gelen bitkicikler, büyütme kaplarından çıkarılarak çeşme suyu altında besi ortamından arıncaya kadar yıkanmıştır. Daha sonra % 0.3'lük benomil etken maddeli fungusite batırılan bitkicikler, 1/1 oranında steril torf/perlit içeren viyollere dikilmiştir (Şekil 3.13). Bitkicikler doku kültürü alıştırma serasında (Şekil 3.14) kültüre alınarak gerekli bakım işlemleri yapılmıştır. Düzenli olarak sulama işlemi yapılmış ve gerekli nem sağlanmıştır. Gerekli durumlarda fungusit uygulaması yapılmıştır.



Şekil 3.13. Bitkiciklerin dış ortama alıştırılması A) Bitkiciklerin musluk suyu altında besi ortamlarından arındırılması, B) Bitkiciklerin kurutma kağıdı üzerinde kurulanması, C) Bitkiciklerin fungusit solüsyonuna daldırılması, D) Bitkiciklerin steril perlit torf karışımı içerisine dikilmesi.



Şekil 3.14. Bitkilerin dış ortama aktarıldığı alıştırma serası

3.2.6. Sentetik Tohum Üretimi

Sentetik tohum üretim denemesinde, deneme VI'dan elde edilen somatik embriyolar kullanılmıştır. Denemede $\frac{1}{2}$ MS ile farklı besi ortamlarının etkisini de araştırmak için, Woody Plant Medium (WPM, Çizelge 3.8, Lloyd ve McCown, 1980) ve Rugini Olive Medium (ROM, Çizelge 3.9, Rugini, 1984) olmak üzere 3 farklı besi ortamı denenmiştir. Her bir ortam için prolin (1 g/l) ve spermin (0.05 g/l) içeren ve içermeyen kültürler kullanılmıştır. Ayrıca denemede çıplak embriyolar (kaplama yapılmamış), jel maddesine besin ortamı konulan ve konulmayan sentetik tohumlar kullanılmıştır. Deneme düzeni Çizelge 3.10'da verilmiştir.

Çizelge 3.8. WPM (Woody Plant Medium) içeriği

İçerik	Miktar (mg/l)
NH ₄ NO ₃	400
Ca(NO ₃) ₂ . 4H ₂ O	556
CaCl ₂ . 2H ₂ O	96
MgSO ₄ . 7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
K ₂ SO ₄	990
FeSO ₄ . 7H ₂ O	27.8
Na ₂ EDTA	37.3
MnSO ₄ . 4H ₂ O	22.3
H ₃ BO ₃	6.2
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8.6
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.25
Myo-inositol	100
Glycine	2
Thiamine. HCl	1
Pyridoxin. HCl	0.5
Nicotinic acid	0.5

Çizelge 3.9. ROM (Rugini olive medium) içeriği

İçerik	Miktar (mg/l)
NH ₄ NO ₃	412
H ₃ BO ₃	12.4
CaCl ₂	332.16
Ca(NO ₃) ₂	416.9
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.025
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.25
Na ₂ EDTA 2H ₂ O	37.5
FeSO ₄ 7H ₂ O	27.8
MgSO ₄ 7H ₂ O	732.5
MnSO ₄ H ₂ O	16.9
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.25
KCl	500
KI	0.83
KNO ₃	1100
KH ₂ PO ₄	340
ZnSO ₄ 7H ₂ O	14.3
D-Biyotin	0.05
Folik asit	0.5
Glisin	2
myo-Inositol	100
Nikotinik asit	5
Piridoksin HCl	0.5
Tiamin HCl	0.5

Çizelge 3.10. Sentetik tohum deneme düzeni

Kaplamasız embriyo	Besi ortamı içermeyen kaplama	Besi ortamı içeren kaplama
MS+ (3 petri, 5 eksplant)	MS+ (3 petri, 5 eksplant)	MS+ (3 petri, 5 eksplant)
MS- (3 petri, 5 eksplant)	MS- (3 petri, 5 eksplant)	MS- (3 petri, 5 eksplant)
WPM+ (3 petri, 5 eksplant)	WPM+ (3 petri, 5 eksplant)	WPM+ (3 petri, 5 eksplant)
WPM- (3 petri, 5 eksplant)	WPM- (3 petri, 5 eksplant)	WPM- (3 petri, 5 eksplant)
ROM+ (3 petri, 5 eksplant)	ROM+ (3 petri, 5 eksplant)	ROM+ (3 petri, 5 eksplant)
ROM- (3 petri, 5 eksplant)	ROM- (3 petri, 5 eksplant)	ROM- (3 petri, 5 eksplant)

+ 1g/l prolin, 0.05 g/l spermin içerir

- Prolin ve spermin içermez

Sentetik tohum üretimi için kullanılacak 1000 µl'lik mikro pipet uçları sentetik tohum büyüklüğüne uygun olacak şekilde kesilmiş ve otoklav edilerek steril hale getirilmiştir. Kullanılacak embriyolar bütün gruplar için homojen olacak şekilde dikkatlice gereken sayıda seçilmiş ve %3 aljinat çözeltisi içerisine atılmıştır. Daha önceden steril edilmiş mikropipet uçları kullanılarak mikropipet ile

embriyolar aljinat ile birlikte çekilerek yavaşça %1,1 kalsiyum klorür çözeltisi içerisine damlatılmıştır. Damlatma işlemi yapılırken sentetik tohumların küre şeklini almasını sağlamak için kalsiyum klorür çözeltisinin içerisinde bulunduğu kap, dairesel olarak çalkalanmıştır. Damlatma işleminden sonra yaklaşık 10 dakika kalsiyum klorür çözeltisi içerisinde bekletilen ve dış kısmı sertleşen sentetik tohumlar steril metal bir süzgece aktarılmıştır. Süzgeç içerisinde birkaç kez steril saf su ile durulanan sentetik tohumların yüzeylerindeki kalsiyum klorür çözeltisi giderilmiştir. Daha sonra steril kurutma kağıdı üzerine serilerek kurutulan sentetik tohumlar, besi ortamlarına aktarılmıştır (Şekil 3.15). Besi ortamlarına aktarılan sentetik tohumlar, tamamen karanlık ortamda ve 24 °C’de kültüre alınmıştır.



Şekil 3.15. Sentetik tohum üretimi A) Embriyoların sodyum aljinat içinden mikropipet ile alınması, B) Embriyoların kalsiyum klorür içerisine damlatılması, C) Sentetik tohumların kurutma kağıdında kurutulması, D) Sentetik tohumların besi ortamlarına aktarılması.

3.2.7. Verilerin Analizi

Tez çalışması kapsamında kurulan denemeler tesadüf parselleri deneme düzenine göre kurulmuştur. Çalışmada yapılan gözlemler sonucu elde edilen veriler Microsoft Excel programında düzenlenmiştir. Düzenlenen veriler JMP8 istatistik programında analiz edilmiştir. Analiz öncesi yüzdellik değerlere açılı transformasyonu yapılmıştır. Değişkenlere ait ortalamalar % 5 önem düzeyinde LSD metodu ile karşılaştırılmıştır.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Yüzeysel Sterilizasyona Ait Bulgular

Sterilizasyon yöntemi için ilk olarak Koçak ve ark. (2014)'nın *C. persicum* türünde yaprak ve yaprak sapı eksplantları için uygulamış oldukları sterilizasyon yöntemi (musluk suyu; 20 dakika, %0.21 HgCl₂; 5 dakika, %70 etil alkol; 1 dakika, %30 Domestos®; 20 dakika) kullanılmıştır. Uygulanan bu yöntem, *C. coum* türü için yeterli olmamıştır. Fungal ve bakteriyel etmenlere bağlı olarak yüksek oranda enfeksiyon oluşumu gözlenmiştir.

Uygulanan 1. sterilizasyon denemesinden sonra eksplantlarda yanma oluşumu gözlenmiştir. Tekrar kurulan 2. sterilizasyon denemesinde bazı aşamaların süresi düşürülmüştür. İkinci sterilizasyon denemesinde, kültürün başlangıç aşamalarında ciddi bir enfeksiyon sorunu yaşanmamıştır ve denemeler bu sterilizasyon yöntemi ile kurulmuştur. Ancak kültürün ileri aşamalarında ve alt kültürler sonrasında yüksek oranda enfeksiyon oluşumu görülmüştür. Enfeksiyon oluşumunun sadece kültür başlangıcında görülmeyip ileri aşamalarda da görülmesi enfeksiyon kaynağının bitkiye ait iç etmenlerden kaynaklandığını göstermektedir. Enfeksiyon oluşumu özellikle yaprak eksplantında görülmüştür. Oluşan bu enfeksiyon sorunu, enfeksiyon oluşmamış kültürlerden somatik embriyogenesis aracılığı ile elde edilen steril bitkilere ait eksplantlar kullanılarak çözülmüştür.

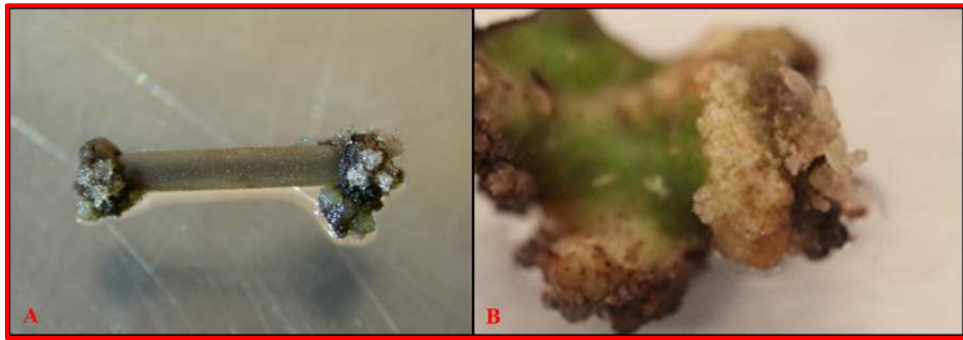
4.2. Deneme I'de Embriyojenik Kültür Bulguları

4.2.1. Deneme I'de Kallus Oluşum Bulguları

Deneme I'de kallus geliştirme ortamında kültüre alınan yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında, kültür başlangıcından 45 gün sonra kallus oluşumu başlamıştır (Şekil 4.1). Yaprak sapı eksplantları kullanılarak kurulan 24 farklı BBD kombinasyonunun hepsinde de farklı oranlarda kallus oluşumu sağlanmıştır. Yaprak sapından elde edilen kallus oranları, BBD kombinasyonuna göre farklılık

göstermiştir. Bu farklılık istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur. En düşük kallus oluşum oranı, % 32.14 ile 1 mg/l NAA ve 1.5 mg/l Kinetin içeren ortamdan (15 nolu ortam) elde edilirken, en yüksek kallus oluşumu %81.28 ile 2 mg/l NAA ve 2 mg/l BA içeren ortamdan (8 nolu ortam) elde edilmiştir (Çizelge 4.1).

Yaprak eksplantı ile kurulan kültürlerde, 1 mg/l NAA ve 0.5 mg/l BA (1nolu ortam), 1 mg/l NAA ve 1 mg/l Kinetin (14 nolu ortam) ve 1 mg/l NAA ve 2 mg/l Kinetin (16 nolu ortam) içeren ortamlarda kallus oluşumu görülmemiştir. Bu ortamlar dışındaki tüm ortamlarda farklı oranlarda kallus oluşumu gözlenmiştir. Kallus oranları arasındaki fark, istatistiki açıdan önemli bulunmuştur. Yaprak eksplantlarından en düşük kallus oluşumu %5'lik oranla 1 mg/l NAA ve 1 mg/l BA içeren ortamdan (2 nolu ortam), en yüksek kallus oluşum oranı ise %25'lik oranla 2 mg/l NAA ve 1 mg/l Kinetin içeren ortamdan (18 nolu ortam) elde edilmiştir (Çizelge 4.1). Koçak ve ark. (2014) ovül, ovaryum, yaprak ve yaprak sapı eksplantlarını kullanarak *C. persicum*'da somatik embriyo elde etmek için yaptıkları çalışmada, eksplant bazında %15.6 ile %34.3 arasında değişim gösteren kallus oranlarını bildirmişlerdir. Winkelmann ve Serek (2005) *C. persicum*'a ait 32 farklı çeşit ile yaptıkları somatik embriyogenesis çalışmasında, eksplant olarak ovül kullanmışlar ve 8 haftalık kültür sonrasında %45 ile %85 arasında değişen kallus oluşum oranlarını elde etmişlerdir.



Şekil 4.1. Yaprak sapı ve yaprak eksplantlarında kallus oluşumunun başlangıcı A) Yaprak sapı eksplantında kallus oluşumu, B) Yaprak eksplantında kallus oluşumu.

En yüksek kallus oranlarının elde edildiği ortamlar incelendiğinde, her iki eksplant tipinde de yüksek NAA içeren ortamların olduğu görülmektedir. Bu ortamlardaki sitokinin içeriğine bakıldığında, hem BA oranı hem de Kinetin oranı değişkenlik göstermektedir.

Kullanılan eksplantlar kallus oluşturma oranları açısından karşılaştırıldığında, bütün ortamlarda yaprak sapı eksplantının yaprak eksplantından daha yüksek oranda kallus oluşturduğu görülmektedir. Bunun sebebi sadece yaprak sapının yaprak eksplantına göre daha rejeneratif olmasından kaynaklanmamakta olup, asıl etken sterilizasyon işleminden kaynaklanmaktadır. Yaprak dokuları yaprak sapı dokularına nazaran daha hassas yapıdadır, bu nedenle de kullanılan sterilizasyon yöntemi yaprak dokularına zarar vermiştir. Buna bağlı olarak yaprak eksplantlarından elde edilen kallus oranlarının daha düşük oldukları düşünülmektedir.

Çizelge 4.1. Deneme I'de yaprak ve yaprak sapı eksplantlarından elde edilen kallus oranları

BBD (mg/l)	Yaprak sapı	Yaprak
1 (1 NAA + 0.5 BA)	38.85 cd (34.05)	0 b (0)
2 (1 NAA + 1 BA)	39.28 bcd (36,42)	5 ab (6)
3 (1 NAA + 1.5 BA)	34.28 d (31,27)	10 ab (12)
4 (1 NAA + 2 BA)	36.14 d (32,34)	10 ab (12)
5 (2 NAA + 0.5 BA)	68.85 abcd (57.19)	12.5 ab (13.55)
6 (2 NAA + 1 BA)	77.71 ab (68.20)	20.83 ab (21.53)
7 (2 NAA + 1.5 BA)	65,57 abcd (58.68)	12.5 ab (13.55)
8 (2 NAA + 2 BA)	81.28 a (70.13)	22 a (22.54)
9 (2.5 NAA + 0.5 BA)	66,57 abcd (55.88)	10.92 ab (12.59)
10 (2.5 NAA + 1 BA)	75 abc (66,42)	16.8 ab (19.02)
11 (2.5 NAA + 1.5 BA)	60.71 abcd (53.57)	13 ab (13.84)
12 (2.5 NAA + 2 BA)	59.28 abcd (52,73)	10.8 ab (12.52)

Çizelge 4.1. devamı

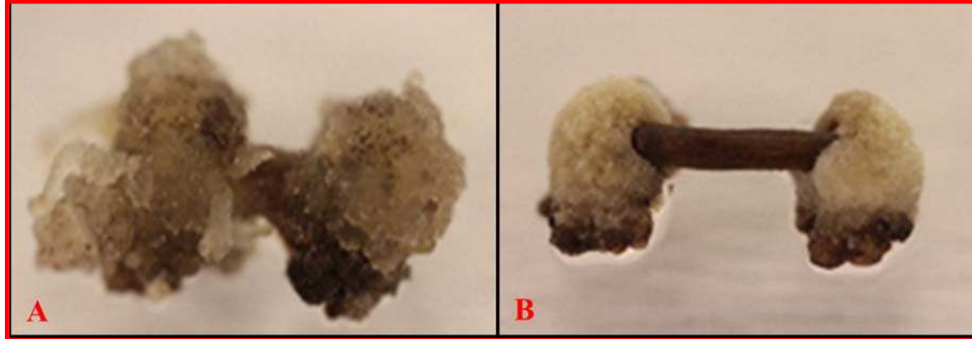
13 (1 NAA + 0.5 Kinetin)	37.57 d (33,27)	15 ab (15.06)
14 (1 NAA +1 Kinetin)	40.57 bcd (37.09)	0 b (0)
15 (1 NAA + 1.5 Kinetin)	32.14 d (27,85)	10.8 ab (15.04)
16 (1 NAA + 2 Kinetin)	36 cd (34.38)	0 b (0)
17 (2 NAA + 0.5 Kinetin)	54.28 abcd (47.63)	9.2 ab (13.83)
18 (2 NAA + 1 Kinetin)	77.71 abc (66.23)	25 a (23.7)
19 (2 NAA + 1.5 Kinetin)	65.57 abcd (58.68)	6.2 ab (9.27)
20 (2 NAA + 2 Kinetin)	75 ab (68.57)	17.8 ab (19.72)
21 (2.5 NAA + 0.5 Kinetin)	71.85 abcd (60)	8.8 ab (11.18)
22 (2.5 NAA + 1 Kinetin)	64.28 abcd (57.85)	16.6 ab (13.13)
23 (2.5 NAA + 1.5 Kinetin)	60.71 abcd (53.57)	13 ab (13.84)
24 (2.5 NAA + 2 Kinetin)	67.85 abcd (57.85)	10.8 ab (15.06)

LSD_{yaprak sapı} = 32.93, LSD_{yaprak} = 21.56 (p<0.05)

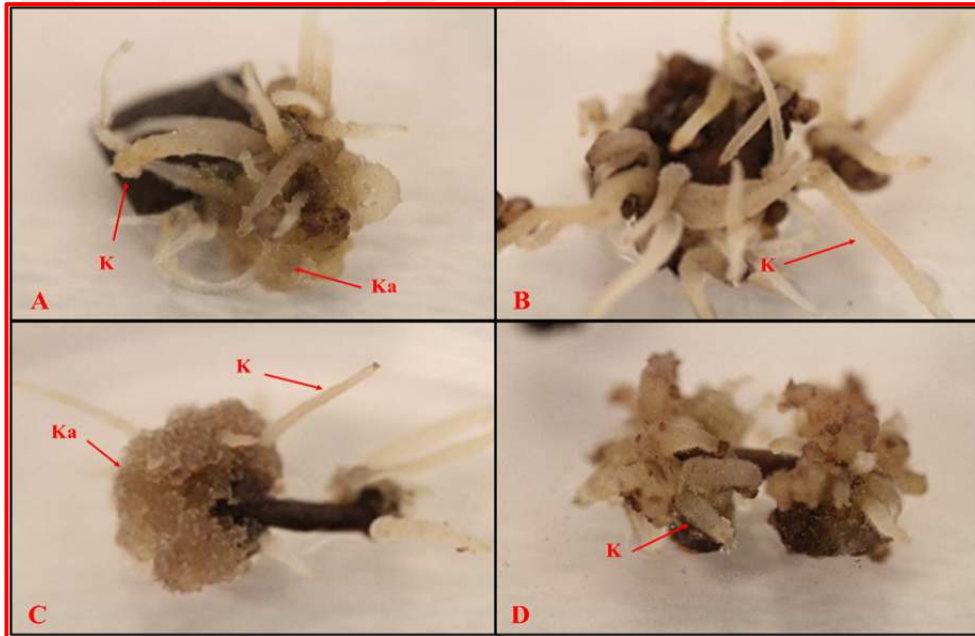
Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlere açı transformasyonu uygulanmış değerlerdir. Farklı harfler farklılıkları belirtmektedir.

4.2.2. Deneme I'de Embriyo Oluşum Bulguları

Denemede farklı yapı ve renklerde kalluslar elde edilmiştir. Bu kalluslardan dağılgan, yumuşak ve açık kahverengi ya da koyu kahverengi arasında olanlar embriyojenik özellik gösterirken, beyazımsı ve dağılgan olmayan kalluslar, embriyojenik özellik göstermemiştir (Şekil 4.2). Benzer sonuçlar daha önce de birçok çalışmada *C. persicum* (Winkelmann ve ark. 1998a, b; Winkelmann 2010; Koçak ve ark., 2014), *C. cilicium* Boiss. et Heldr., *C. parviflorum* Pobed., *C. mirabile* Hildebr. ve *C. pseudibericum* Hildebr. (İzgü ve ark., 216) ve *C. coum* (Prange ve ark. 2010b) için rapor edilmiştir. NAA'nın etkisiyle bazı eksplantlarda kök oluşumu görülmüştür (Şekil 4.3).



Şekil 4.2. Elde edilen kallus yapıları A) Embriyojenik kallus yapısı, B) Embriyojenik olmayan kallus yapısı



Şekil 4.3. Deneme I'de eksplantlarda kök oluşumu A), B) Yaprak eksplantlarında kök oluşumu, C), D) Yaprak sapı eksplantlarında kök oluşumu (K: Kök, Ka: Kallus)

Denemede beşinci aydan itibaren somatik embriyoların oluştuğu gözlenmiştir. Kullanılan 24 farklı ortamdan, 8 tanesinde somatik embriyo oluşmuştur. Bu ortamlar 4 (1 mg/l NAA + 2 mg/l BA), 7 (2 mg/l NAA + 1.5 mg/l BA), 8 (2 mg/l NAA + 2 mg/l BA), 9 (2.5 mg/l NAA + 0.5 mg/l BA), 10 (2.5 mg/l

NAA + 1 mg/l BA), 11 (2.5 mg/l NAA + 1.5 mg/l BA), 18 (2 mg/l NAA + 1 Kinetin) ve 20 (2 mg/l NAA + 2 mg/l Kinetin) nolu ortamlardır. Embriyo oluşturan bu ortamlar incelendiğinde, oksin (NAA) miktarının yüksek olduğu ortamlar olduğu görülmektedir. Sitokinin (BA ve Kinetin) miktarının ise değişkenlik gösterdiği anlaşılmaktadır. Bu denemenin ileri aşamalarında görülen enfeksiyon sorunu nedeni ile deneme deseni bozulmuştur. Buna bağlı olarak ortamlar bazında embriyo oluşum oranları istatistiki olarak analiz edilememiştir. Somatik embriyo oluşumunu etkileyen en önemli faktörlerden birisi ortam içeriğinde bulunan ve embriyojenik indüksiyonu sağlamak amacı ile kullanılan oksin grubu bitki büyüme ve gelişim düzenleyici maddelerdir. Embriyojenik uyartımda başarıyı sağlayan oksinler, türler arasında ve hatta tür içinde farklı genotiplerde bile değişkenlik göstermektedir. Tez çalışması kapsamında *C. coum* türünde NAA içeren ortamlardan embriyojenik yapılar elde edilirken, Prange ve ark (2010b) aynı türde 2,4-D ile embriyojenik uyartımı sağlamışlardır. Benzer şekilde Seyring ve ark. (2009) da *C. coum*'da somatik embriyoları 2,4-D kullanarak elde etmişlerdir.

Somatik embriyo oluşumunda genotip etkisinin önemli olduğu bilinmektedir. Bu deneme 10 farklı genotipten alınan eksplantlar ile kurulmuştur. Denemede kullanılan 10 farklı genotipten 3 tanesinde (TCC-10, TCC-20 ve TCC-55) embriyo oluşumu gerçekleşmiştir. Bu genotiplerden TCC-55 diğer genotiplere oranla daha fazla sayıda farklı besi ortamında embriyo oluşturmıştır. Bu durum somatik embriyogenesis oluşumundaki genotip etkisini yapılan tez çalışmasında da açıkça ortaya koymaktadır. Prange ve ark. (2010b) *C. coum*'da yapmış oldukları çalışmada 10 farklı genotip kullanmışlardır. Kullandıkları 10 farklı genotipten yalnızca 1 tanesinden embriyojenik kallus yapıları elde etmişlerdir. Koçak ve ark. (2014) Türkiye'de doğal olarak yayılış gösteren *Cyclamen persicum* türünde yapmış oldukları çalışmada, farklı eksplant tiplerini kullanarak somatik embriyoları elde etmişlerdir. Çalışmada *C. persicum*'a ait 15 farklı genotip kullanılmış ve embriyojenik kallus ve embriyo oluşturma oranları açısından genotip etkisinin etkili olduğu bildirilmiştir. Winkelmann ve Serek (2005) *C. persicum*'da 32 farklı çeşit bitki ile yaptıkları çalışmada, sadece 1 tanesi hariç bütün çeşitlerde somatik embriyoları elde etmişlerdir.

Embriyo oluşumu eksplantın farklı bölgelerinden oluşmaya başlamıştır. Eksplantın ortama temas ettiği alt kısımdan embriyo oluşumu görüldüğü gibi, eksplantın üst kısımlarından da embriyo oluşumu görülmüştür. (Şekil 4.4 ve 4.5).



Şekil 4.4. Somatik embriyoların eksplantın alt bölgelerinden oluşması (E: Embriyo)

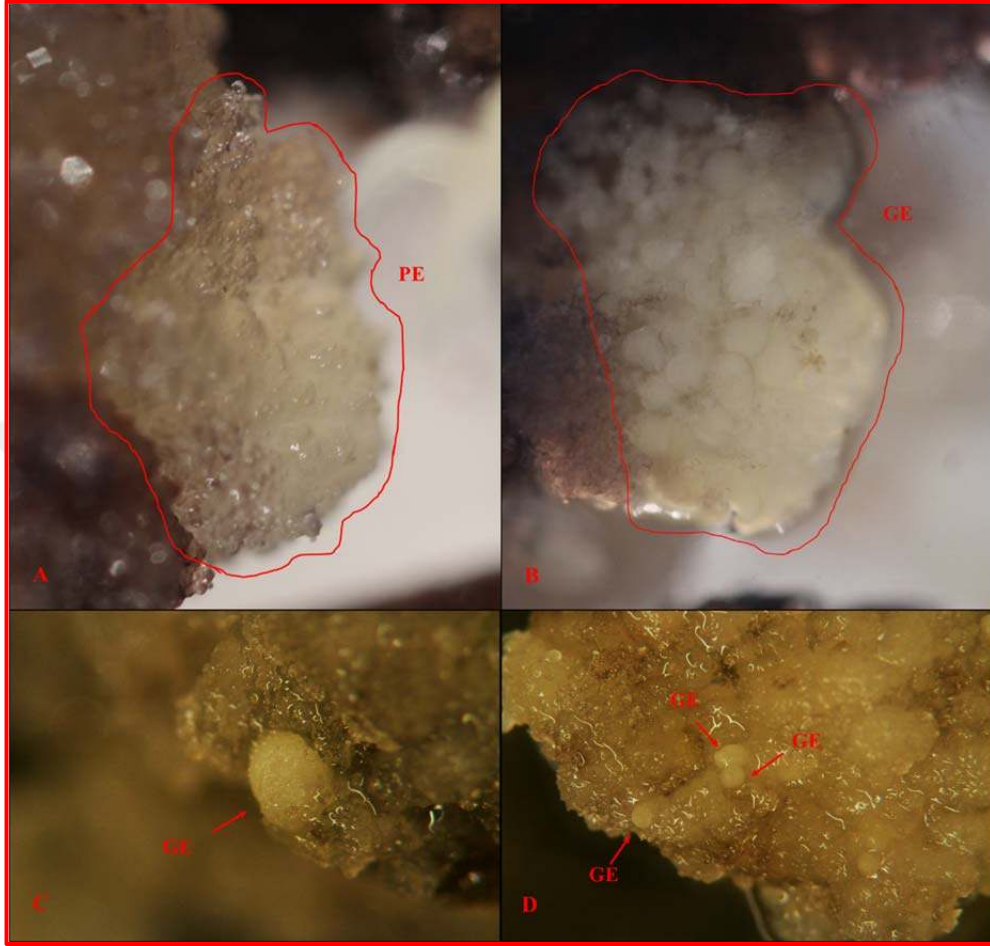


Şekil 4.5. Somatik embriyoların eksplantın üst bölgelerinden oluşması (E: Embriyo)

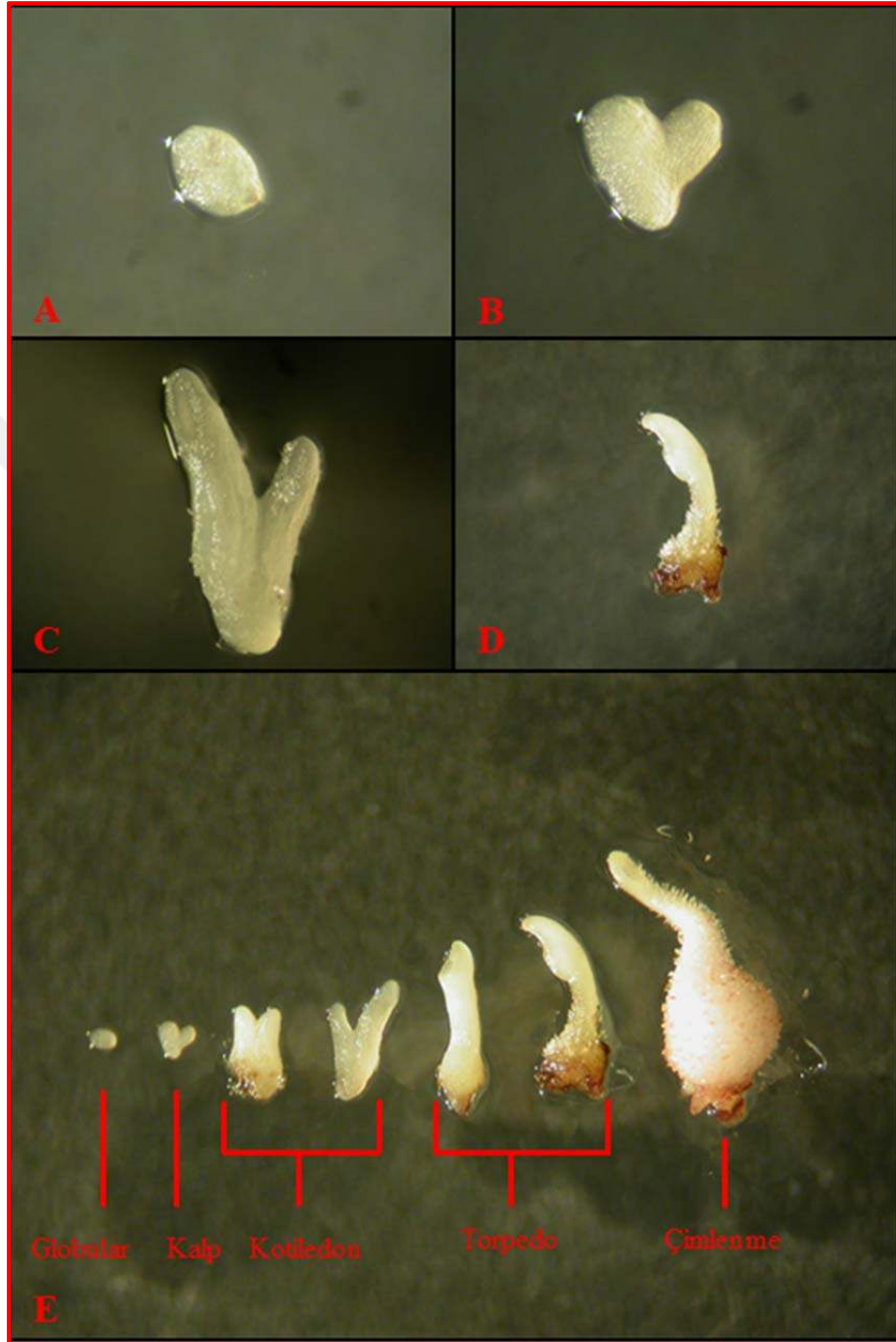
Somatik embriyo oluşumundan önce kahverengi olan embriyogenik kallus yapıları farklılaşarak daha açık renkte ve şeffaf yapılı proembriyonik yapıları oluşturmuştur (Şekil 4.6, A). Bu proembriyonik yapılarda farklılaşarak somatik embriyonun ilk safhası olan globular yapıları meydana getirmişlerdir (Şekil 4.6).

Somatik embriyolar da zigotik embriyolarda olduğu gibi globular, kalp, torpedo ve kotiledon aşamalarından geçerek bitkiyi oluşturmaktadır. Bu aşamalar tez çalışması kapsamında izlenerek görüntülenmiştir (Şekil 4.7). Bu aşamalardan kalp safhası oldukça seyrek görülmektedir. Çoğu embriyo bu safhayı atlamakta, doğrudan globular safhadan torpedo safhasına geçiş yapmaktadır. Çimlenme karanlık ortamda aydınlık ortama nazaran daha hızlı gerçekleşmiş ve çimlenme oranı daha yüksek olmuştur. You ve ark. (2011) da aydınlık ortamda somatik embriyo çimlenmesinin ve kök oluşumunun karanlık ortama göre daha başarılı olduğunu bildirmişlerdir.

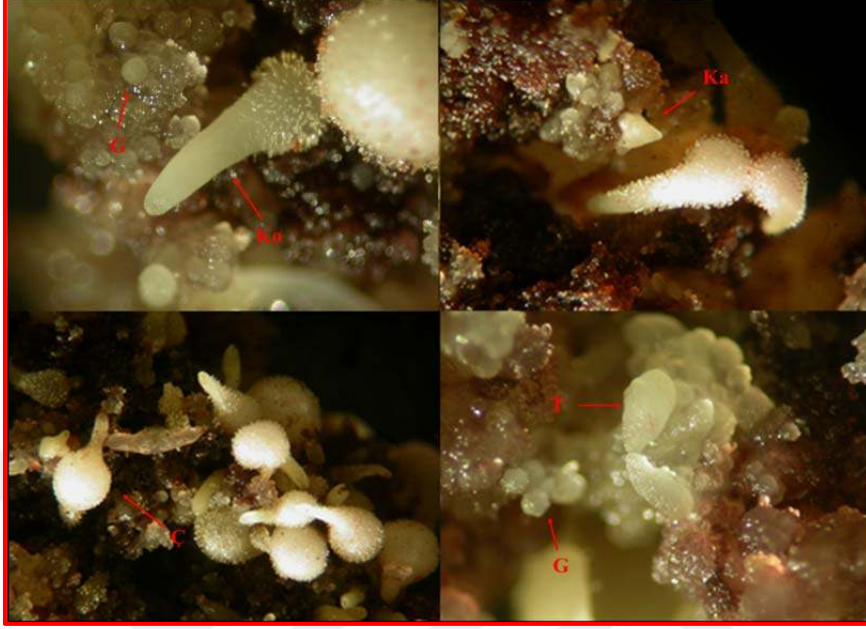
Somatik embriyogenesiste görülen sorunlardan bir tanesi de somatik embriyoların eş zamanlı olarak gelişmemesi yani belirli bir zaman diliminde bir kültür içerisinde farklı aşamalarda embriyoların bulunması ve bu embriyoların farklı zaman diliminde çimlenmeleri olayıdır. Bu durum yapılan tez çalışmasında da ön plana çıkan bir durum olmuştur. Elde edilen embriyolarda farklı aşamalarda embriyo gözlenmiştir (Şekil 4.8). Eşzamansız gelişimin, somatik embriyo oluşumunun ilk aşamalarında yani globular aşamanın oluşması esnasında başladığı görülmüştür. Pro-embriyonik yapıların globular yapılara dönüşümü farklı aşamalarda gerçekleşmektedir (Şekil 4.5 (B)). Eşzamansız embriyo gelişiminin sebepleri henüz bilinmemektedir, bu nedenle de kontrolü sağlanamamaktadır (Rode ve ark., 2011). Eşzamansız embriyo gelişimi kitlesel üretimde istenmeyen bir durum olarak karşımıza çıksada, bazı durumlarda avantaj sağlamaktadır. İyi geliştirilmiş bir protokolda oldukça yüksek sayıda somatik embriyo elde edilebilmektedir. Embriyo gelişimlerinin eşzamanlı olması bu miktardaki somatik embriyonun eş zamanlı olarak transfer edilmesi ya da sentetik tohum gibi işlemlere tabi tutulmasında işgücünde gerekli zaman açısından sorunlara yol açabilecektir.



Şekil 4.6. Kallus yapılarının farklılaşarak somatik embriyoların oluşması A) Kallus yığınlarının farklılaşması ile oluşan proembriyonik yapılar, B) proembriyonik yapıların farklılaşması ile oluşan globular embriyolar, C), D) Globular embriyolar (FK: Farklılaşmış kallus, PE: Pro-embriyonik yapı, G: Globular embriyo)

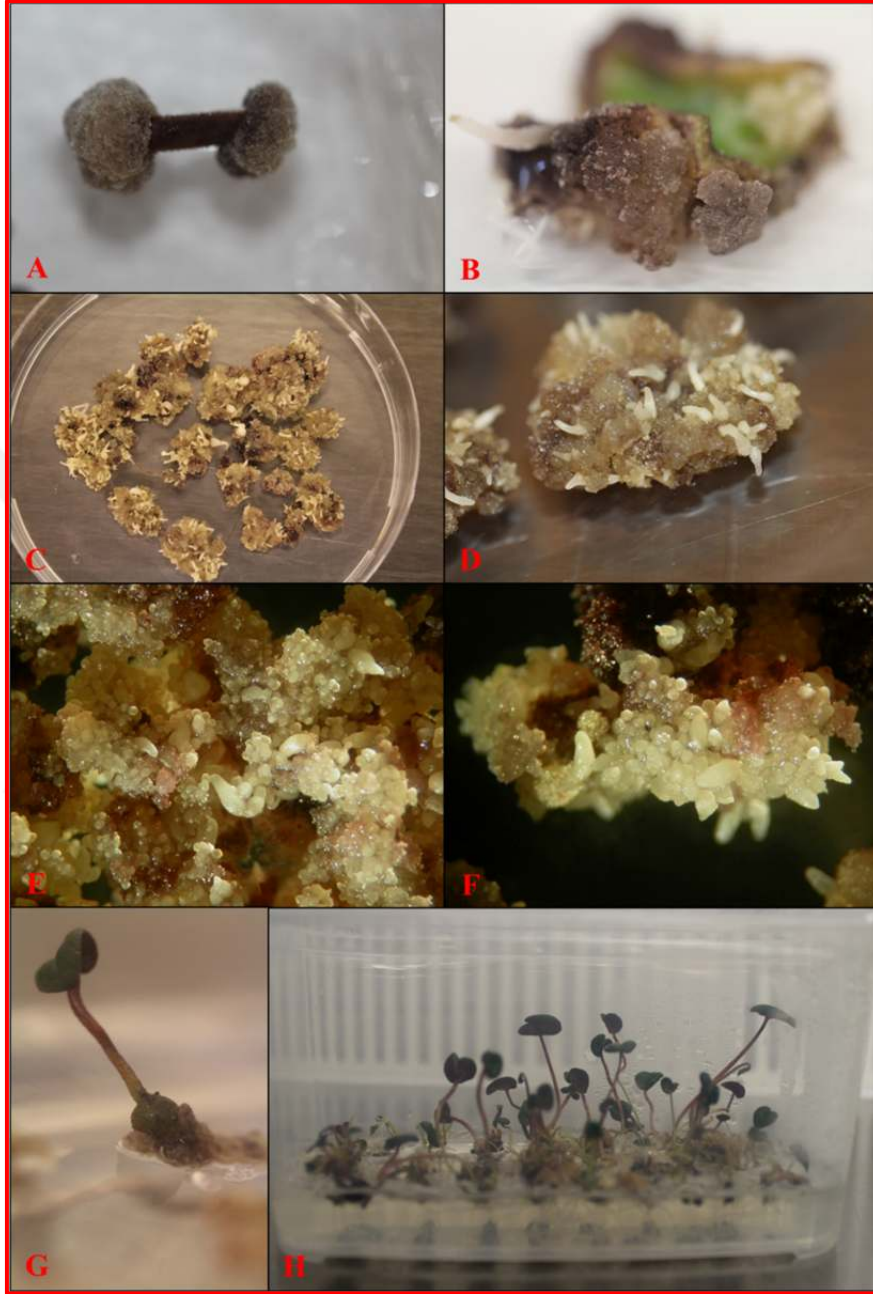


Şekil 4.7. Somatik embriyoların farklı gelişim aşamaları A) Globular safha, B) Kalp safhası, C) Kotiledon, D) Torpedo, E) Farklı gelişim aşamaları.



Şekil 4.8. Embriyo kültürlerindeki eşzamansız büyüme (G: Globular, Ka: Kalp, T: Torpedo, Ko: Kotiledon, Ç: Çimlenme)

Kallus miktarlarındaki artış farklılaştırma ortamında da (hormon içermeyen ortam) devam etmiştir. Kallus miktarının bu ortamda çoğalması aynı zamanda embriyo oluşum miktarını da arttırmıştır. Bu ise kültürlerin düzenli olarak alt kültüre alınması ile sağlanmıştır. Alt kültür sadece besi ortamını tazelemek amacı ile yapılmamaktadır. Yeni alt kültürde oluşan embriyolar zaman içerisinde büyümekte ve kültür içerisindeki besin içeriğini tüketmektedir. Bunun yanı sıra, embriyoların büyümesi ile birlikte kültür içerisindeki alanları daralmaktadır. Bu etkenlerde kültür içerisindeki gelişmeyi sınırlandırmaktadır. Kültürler düzenli olarak alt kültüre alınırken her bir petrideki eksplantlar daha fazla sayıda petri içerisine aktarılmıştır. Böylece her alt kültürde büyümeyi sınırlayan etmenler kaldırılarak daha fazla kallus oluşumu ve dolaylı olarak da embriyo üretimi arttırılmıştır. You ve ark. (2011) alt kültür sayısının somatik embriyogenesis oranını etkilemediğini ancak somatik embriyo üretimini etkilediğini bildirmişlerdir. Kallus oluşumundan bitkiciklerin elde edilmesi sürecine kadar geçen farklı kültürler Şekil 4.9’da verilmiştir.

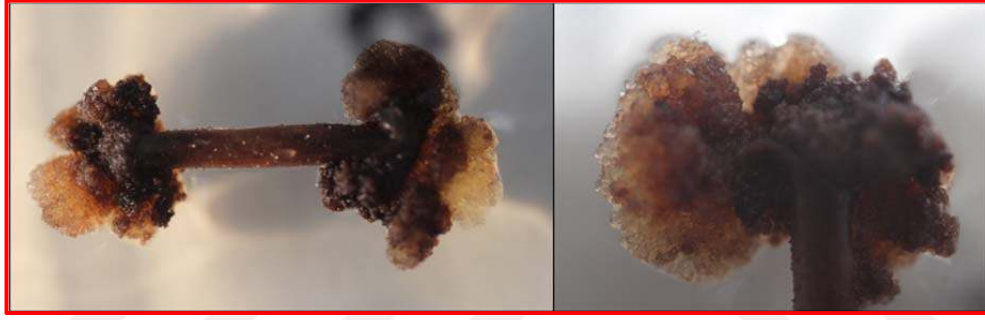


Şekil 4.9. Kültür başlangıcından bitkiciklere dönüşüm aşamaları A), B) Eksplantlardan ilk kallus oluşum aşaması, C), D) Embriyojenik kalluslardan embriyoların oluşması, E), F) Somatik embriyolar G), H) Somatik embriyogenesis ile elde edilmiş bitkicikler

4.3. Deneme II’de Embriyojenik Kültür Bulguları

4.3.1. Deneme II’de Kallus Oluşum Bulguları

Bu denemede yaprak ve yaprak sapı eksplantlarından kallus oluşumu, kültür başlangıcından 2 ay sonra başlamıştır. Yaprak sapı eksplantlarından elde edilen kallus oranı, %43.18 olarak hesaplanırken, yapraklardan elde edilen kallus oranı ise %17.18 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen kallus yapıları önceleri açık kahverengi renkte iken kültürün ilerleyen aşamalarında kararmıştır. Belli bir büyüklüğe ulaşan kalluslar daha fazla gelişim göstermemiştir (Şekil 4.10).

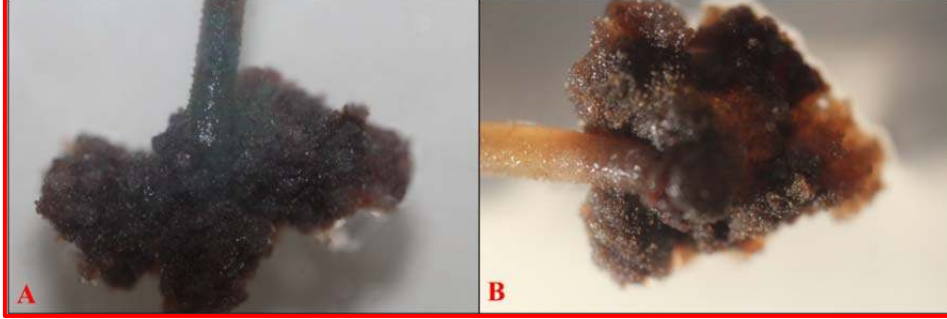


Şekil 4.10. Deneme II’den elde edilen kallus yapıları

4.4. Deneme III’de Embriyojenik Kültür Bulguları

4.4.1. Deneme III’de Kallus Oluşum Bulguları

Deneme III’te kullanılan iki farklı ortamdan da hem yaprak hem de yaprak sapı eksplantından kallus üretimi sağlanmıştır. Bu ortamlardan, 1 mg/l 2,4-D ve 0,4 mg/l 2-iP içeren ½ MS ortamında yaprak sapı eksplantlarından %11.12 kallus oluşumu gözlenmiştir. Aynı ortamda yapraktan kallus oluşumu ise %6.81 olarak tespit edilmiştir. Bu denemede kullanılan diğer ortamdan (2 mg/l 2,4-D ve 0,8 mg/l 2-iP içeren MS ortamı) yaprak sapından %18.05 kallus oluşumu, yapraktan ise %4.16 kallus oluşumu tespit edilmiştir. Kallus oluşumu kültür başlangıcından 2 ay sonra başlamıştır. Kallus miktarı çok fazla ilerlemeden durmuştur. Bu süreçten sonra kalluslar kararmaya başlamıştır (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Deneme III'te elde edilen kallus yapıları A) 1 mg/l 2,4-D ve 0,4 mg/l 2-iP içeren $\frac{1}{2}$ MS ortamından elde edilen kallus yapısı, B) 2 mg/l 2,4-D ve 0,8 mg/l 2-iP içeren MS ortamından elde edilen kallus yapısı.

4.5. Deneme IV'te Embriyojenik Kültür Bulguları

4.5.1. Deneme IV'te Kallus Oluşum Bulguları

Deneme IV'te eksplantlar 4°C'de 1 ay boyunca kültüre alınmış olup, bu süre boyunca herhangi bir gelişme görülmemiştir. Bu süre sonunda büyütme odasında kültüre alınan eksplantlarda farklı oranlarda kallus oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4.12). Kallus oluşumu büyütme odasına transferden 2 ay kadar sonra başlamıştır. Kallus oluşumları ancak belli bir aşamaya kadar ulaşmış, daha sonra gelişim durmuş ve kararmalar meydana gelmiştir.



Şekil 4.12. Deneme IV'te görülen kallus yapısı

Bazı ortamlarda ise herhangi bir gelişme ve kallus oluşumu gözlenmemiştir. Yaprak sapı eksplantları ile kurulan denemeden 1 (1 mg/l NAA + 0.5 mg/l BA), 3 (1 mg/l NAA + 1.5 mg/l BA), ve 11 (2.5 mg/l NAA + 1.5 mg/l BA) no'lu ortamlardan kallus oluşumu gözlenmemiştir. Diğer ortamlardan ise %4.16 - %15 arasında değişen oranlarda kallus elde edilmiştir. Kallus oluşturma oranları arasındaki farklılık istatistiki açıdan önemli bulunmuştur (Çizelge 4.2). Yaprak eksplantlarından ise 1 (1 mg/l NAA + 0.5 mg/l BA), 2 (1 mg/l NAA + 1 mg/l BA), 4 (1 mg/l NAA + 2 mg/l BA), 6 (2 mg/l NAA + 1 mg/l BA), 11 (2.5 mg/l NAA + 1.5 mg/l BA) ve 12 (2.5 mg/l NAA + 2 mg/l BA) no'lu ortamlardan kallus elde edilmemiştir. Diğer ortamlardan ise %5 - %10 arasında değişen kallus oluşumu görülmüştür. Ancak bu farklılık istatistiki açıdan önemli bulunmamıştır. (Çizelge 4.2). Kullanılan eksplantlar karşılaştırıldığında yaprak sapı eksplantının hem oran olarak hem de kallus oluşturan ortam sayısı bakımından daha başarılı olduğu görülmektedir. Bunun nedeni yaprak eksplantlarının soğukta bekletilmesi sırasında canlılıklarını yaprak sapları kadar muhafaza edememesi ile açıklanabilir. Bu denemeden elde edilen kallus oranları, deneme I'de aynı ortamlar ile elde edilen oranlar ile karşılaştırıldığında, soğuk uygulamasının kallus oluşum oranlarını her iki eksplant tipinde de düşürdüğü anlaşılmaktadır.

Çizelge 4.2. Deneme IV'te elde edilen kallus oranları (%)

BBD (mg/l)	Yaprak Sapı	Yaprak
1 (1 NAA + 0.5 BA)	0 c (0)	0 (0)
2 (1 NAA + 1 BA)	8.32 abc (11.68)	0 (0)
3 (1 NAA + 1.5 BA)	0 c (0)	5 (7.15)
4 (1 NAA + 2 BA)	4.16 bc (6.69)	0 (0)
5 (2 NAA + 0.5 BA)	15 ab (17.9)	6.25 (9.82)
6 (2 NAA + 1 BA)	18.75 a (22.20)	0 (0)
7 (2 NAA + 1.5 BA)	9.58 abc (10.31)	6.25 (9.82)
8 (2 NAA + 2 BA)	15 ab (16.04)	10 (10.57)
9 (2.5 NAA + 0.5 BA)	4.16 bc (6.69)	5 (7.15)
10 (2.5 NAA + 1 BA)	9.37 abc (9.37)	10 (10.57)
11 (2.5 NAA + 1.5 BA)	0 c (0)	0 (0)
12 (2.5 NAA + 2 BA)	5bc (8.59)	0 (0)

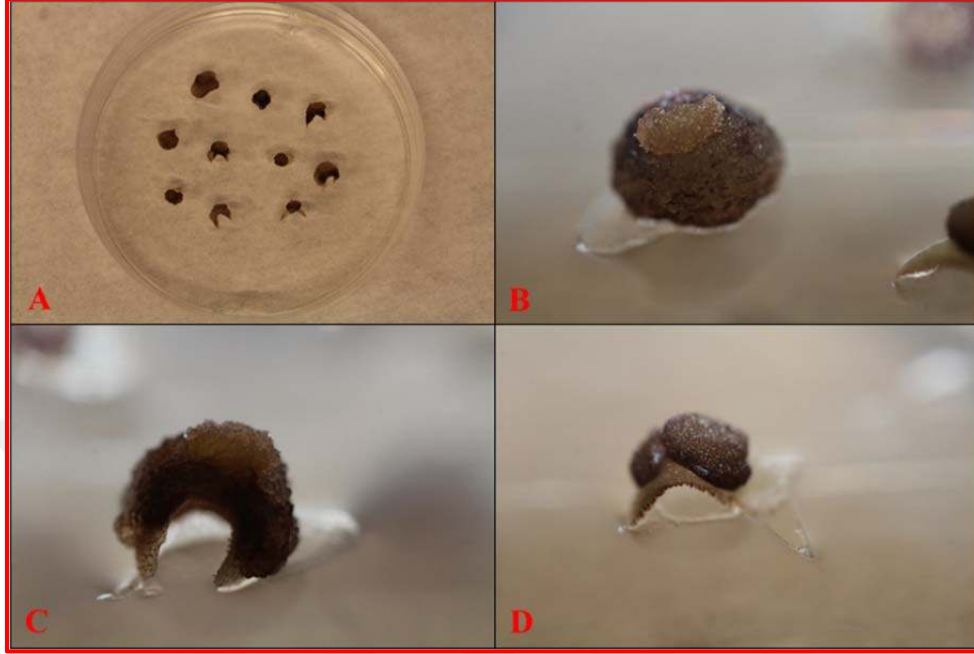
LSD_{yaprak sapı} = 13.15, LSD_{yaprak} = 11.91 (p<0.05)

Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlere açılı transformasyonu uygulanmış değerlerdir. Farklı harfler farklılıkları belirtmektedir.

4.6. Deneme V'te Embriyojenik Kültür Bulguları

4.6.1. Kallus Bulguları

Yaprak sapı diskleri kullanılarak kurulan bu denemede, 1 ay sonrasında kallus oluşumları gözlenmeye başlanmıştır. Kallus oluşumu yaprak sapı disklerinin orta noktasından oluşmaya başlamıştır. Ancak kallus oluşumu oldukça sınırlı kalmıştır ve kallus yapıları daha fazla büyüme gösterememiştir (Şekil 4.13). Kullanılan ortamlar ele alınarak değerlendirildiğinde, kallus oluşum oranları oldukça yakınlık göstermiştir. Elde edilen bu oranlar arasındaki farklar istatistiki açıdan anlamlı bulunmamıştır (Çizelge 4.3). Yaprak sapı diskleri yaprak ve yaprak sapı eksplantlarına oranla daha küçük olmaları nedeni ile daha düşük oranda enfeksiyon oluşumu göstermiştir ancak kallus geliştirme potansiyelleri oldukça sınırlı kalmıştır. Kallus oluşumu sadece başlangıç aşamasında kalmıştır yeterince büyüme sağlanamamıştır.



Şekil 4.13. Deneme V’te yaprak sapı disklerinin kültüre alınması ile elde edilen kallus yapıları, A) Eksplantların petrideki genel görünümü, B), C), D) farklı eksplantlara ait kallus yapıları.

Çizelge 4.3. Deneme V’te elde edilen kallus oranları

BBD (mg/l)	Kallus oranı (%)
6 (2 NAA + 1 BA)	55 (49.58)
8 (2 NAA + 2 BA)	52 (47.56)
18 (2 NAA + 1 Kinetin)	54 (48.92)
20 (2 NAA + 2 Kinetin)	59 (50.35)

LSD= 16.46 ($p<0.05$)

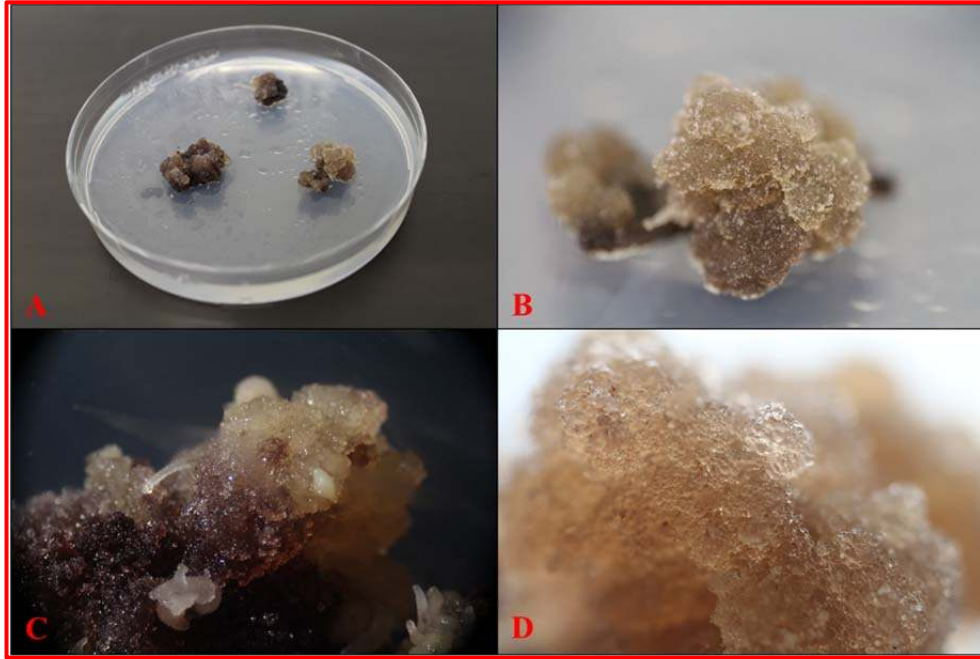
Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlere açılı transformasyonu uygulanmış değerlerdir.

4.7. Deneme VI’da Embriyojenik Kültür Bulguları

4.7.1. Kallus Bulguları

Bu denemede 3 hafta içerisinde kallus oluşumu başlamıştır. Kalluslar oldukça dağılgan ve şeffaf yapı göstermişlerdir (Şekil 4.14). Yaprak sapı eksplantlarından en yüksek kallus oluşum oranı %91.22’lik oran ile 18 (2 NAA + 1

Kinetin) ve 20 (2 NAA + 2 Kinetin) no'lu ortamlardan elde edilmiştir. Bu ortamları, %85.96 ve %84.21'lik oranlar ile 6 (2 NAA + 1 BA) ve 8 (2 NAA + 2 BA) no'lu ortamlar takip etmiştir. Yaprak sapı eksplantından farklı ortamlar kullanılarak elde edilen kallus oluşum oranları, istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır (Çizelge 4.4). Yaprak eksplantlarından ise en yüksek kallus oranı %92.30 ile 18 (2 NAA + 1 Kinetin) no'lu ortamdan elde edilmiştir. Bu ortamı 89,74'lik oranla 8 (2 NAA + 2 BA) ve 20 (2 NAA + 2 Kinetin) no'lu ortamlar ile 87,17'lik oranla 6 (2 NAA + 1 BA) no'lu ortamlar takip etmiştir. Elde edilen bu oranlar istatistiki olarak önemli bulunmamıştır (Çizelge 4.4).



Şekil 4.14. Deneme VI'dan elde edilen kallus yapıları A) Petriden genel görünüm, B), C), D) Kallusların yakından görünümü

Sıklamende kallus ile rejenersayon için yumru (Loewenberg, 1969; Geier, 1977; Bian ve ark., 2008; 2010), yaprak (Wicart ve ark., 1984; Otani ve Shimada, 1991; Dillen ve ark., 1996; Terakawa ve ark., 2008; Gou ve ark., 2008; You ve

ark., 2008; Prange ve ark., 2010b; Naderi ve ark., 2012; Kocak ve ark., 2014), yaprak sapı (Wicart ve ark., 1984; Kiviharju ve ark., 1992; You ve ark., 2008; Naderi ve ark., 2012; Kocak ve ark., 2014), anter (Geier, 1977; Kiviharju ve ark., 1992), çiçek sapı (Kiviharju ve ark., 1992; Gou ve ark., 2008; Nhut ve ark., 2012), ovaryum (Wicart ve ark., 1984; Kiviharju ve ark., 1992; Kocak ve ark., 2014), ovul (Ishizaka ve Uematsu, 1992; 1995; Schwenkel ve Winkelmann, 1998; Winkelmann ve ark., 1998a,b; Winkelmann ve ark., 2006; Ishizaka, 2008; Lyngved ve ark., 2008; Prange ve ark., 2010a; Rode ve ark., 2012; Kocak ve ark., 2014), kök (Oohashi ve ark., 1992) ve fide (Takamura ve ark., 1995; Karam ve Al-Majathoub, 2000a; Prange ve ark., 2008) gibi eksplantlarının kullanıldığı bildirilmiştir. Seyring ve ark. (2009), *C. coum*'da ovaryum, yaprak, yaprak sapı ve çiçek sapı eksplantlarını kullanarak yaptıkları çalışmada, %80'in üzerinde kallus oluşumu elde etmişlerdir. Bu sonuçlar tez çalışmasında elde ettiğimiz sonuçlara yakın değerlerdir. İzgü ve ark. (2016) 4 farklı doğal siklamen türünde (*C. cilicium* Boiss. et Heldr., *C. parviflorum* Pobed., *C. mirabile* Hildebr. and *C. pseudibericum* Hildebr.) yaptıkları çalışmada eksplant olarak yaprak, yaprak sapı, ovül ve ovaryumu kullanmışlardır. Çalışmada, embriyojenik kallus uyartımı, 2,4-D ve 2-iP kullanılarak sağlanmıştır. Çalışmada elde edilen kallus oluşum yüzdeleri, türler ve kullanılan eksplant tipine bağlı olarak değişim göstermiştir. Türler bazında en yüksek kallus oluşum oranları %56 ile *C. cilicium* ve %59 ile *C. parviflorum* türlerinden yaprak eksplantından elde edilirken, %80 ile *C. mirabile* ve %100 ile *C. pseudibericum* türlerinde yaprak sapı eksplantlarından elde edilmiştir.

Çizelge 4.4. Deneme VI'dan elde edilen kallus oranları

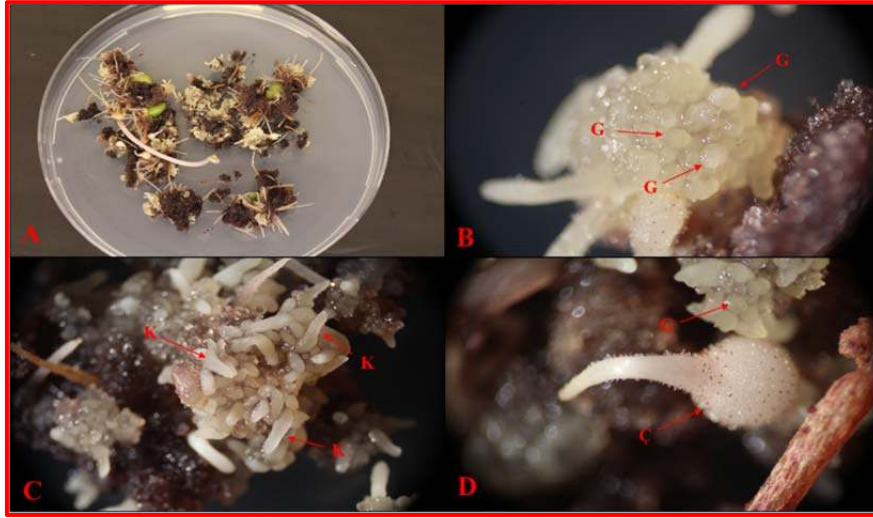
BBD (mg/l)	Yaprak Sapı (%)	Yaprak (%)
6 (2 NAA + 1 BA)	85,96 (76,81)	87,17 (77,65)
8 (2 NAA + 2 BA)	84,21 (75,79)	89,74 (80,36)
18 (2 NAA + 1 Kinetin)	91,22 (81,55)	92,30 (83,07)
20 (2 NAA + 2 Kinetin)	91,22 (81,55)	89,74 (80,36)

LSD_{yaprak sapı} = 12.59, LSD_{yaprak} = 16.40 (p<0.05)

Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlere açı transformasyonu uygulanmış değerlerdir.

4.7.2. Deneme VI'da Embriyo Bulguları

Bu denemede kültür başlangıcından 3 ay sonra somatik embriyolar oluşmaya başlamıştır. Denemede kullanılan bütün ortamlarda (6 nolu ortam: 2 mg/l NAA + 1 mg/l BA, 8 nolu ortam: 2 mg/l NAA + 2 mg/l BA, 18 nolu ortam: 2 mg/l NAA + 1 mg/l Kinetin ve 20 nolu ortam: 2 mg/l NAA + 2 mg/l Kinetin) ve her iki eksplant (yaprak ve yaprak sapı) tipinde de embriyo oluşumu sağlanmıştır (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Deneme VI'dan elde edilen embriyolar A) Petriden genel görünüm; B, C) Farklı aşamalarda somatik embriyolar, D) Çimlenme aşamasındaki somatik embriyo.

Embriyo oluşumları eksplant bazında değerlendirildiğinde, yaprak sapından en yüksek embriyo oluşumu, %68.42'lik oranla 2 mg/l NAA ve 2 mg/l Kinetin içeren ortamdan elde edilmiştir. Bu ortamı, %59.64 ile 2 mg/l NAA + 1 mg/l BA, %57.89 ile 2 mg/l NAA + 1 mg/l Kinetin ve %47.36 ile 2 mg/l NAA + 2 mg/l BA içeren ortamlar takip etmiştir. Yaprak eksplantından en iyi embriyo oluşum oranı ise %69.23'lük oranla 2 mg/l NAA + 1 mg/l Kinetin içeren ortamdan elde edilmiştir. Diğer ortamlar ise %61.53, %48.71 ve %43.58 oranında embriyo üretmişlerdir (Çizelge 4.5). Yaprak eksplantından elde edilen oranlar incelendiğinde, Kinetin içeren ortamların BA içeren ortamlardan daha yüksek oranda embriyo ürettikleri görülmektedir. Ancak yaprak sapından elde edilen oranlar değerlendirildiğinde belirgin bir sitokinin etkisi görülmemektedir. Embriyo oluşum oranları arasındaki farklar istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır (Çizelge 4.5). Seyring ve ark. (2009) *C. coum* ve diğer siklamen türlerinde yaptıkları çalışmada iki farklı protokol denemişlerdir. İlk protokolda 9.05 µmol/l 2,4-D ve 3.94 µmol/l 2-iP içeren MS ortamını kullanmışlardır. İkinci protokolda ise 6.66 µmol/l ve 5.71 µmol/l IAA içeren N69 ortamı kullanmışlardır. Test edilen bu protokollerden ikincisinde *C. coum*'da başarılı sonuçlar elde edilemezken, ilk protokolden somatik embriyo benzeri yapılar elde edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan yaprak eksplantlarından %10 oranında rejenerasyon görülürken, ovaryum eksplantından %30 oranında rejenerasyon sağlanmıştır.

Çizelge 4.5. Deneme VI'da elde edilen embriyo oranları

BBD (mg/l)	Yaprak Sapı (%)	Yaprak (%)
6 (2 NAA + 1 BA)	59.64 (53.13)	48.71 (43.03)
8 (2 NAA + 2 BA)	47.36 (40.96)	43.58 (37.61)
18 (2 NAA + 1 Kinetin)	57.89 (52.93)	69.23 (62.30)
20 (2 NAA + 2 Kinetin)	68.42 (59.91)	61.53 (55.38)

LSD_{yaprak sapı} = 20.94, LSD_{yaprak} = 28.03 (p<0.05)

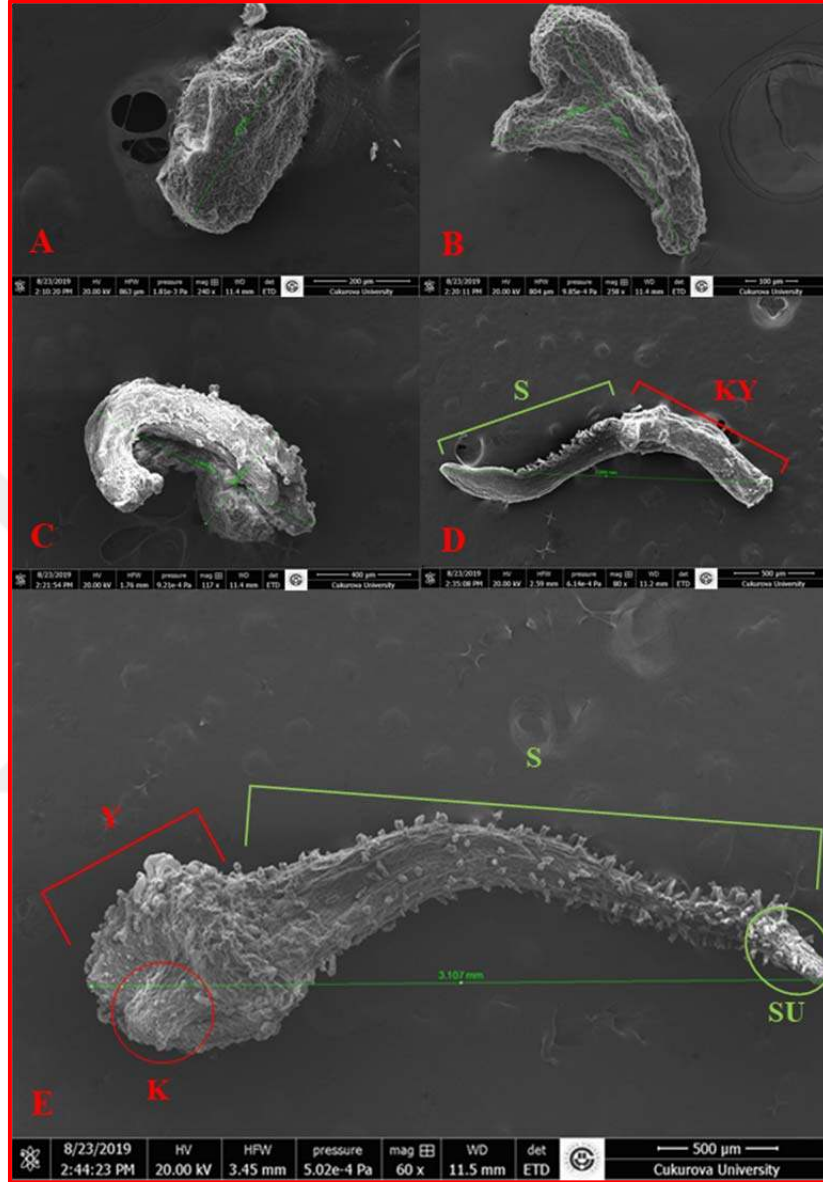
Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlere açı transformasyonu uygulanmış değerlerdir

Bu denemede embriyojenik yapıların oluşumu için oksin olarak NAA kullanılmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır. Siklamenin diğer bir türü olan *Cyclamen persicum*'da ise yapılan birçok çalışmada 2,4-D etkili bulunmuştur. Terakawa ve ark. (2008) *Cyclamen persicum* cv. "Fragrance Mini"de, transformasyon sistemi için geliştirdikleri rejenerasyon protokolünde 2,4-D ve Kinetin içeren ortamlarda yaprak segmentlerini kültüre alarak embriyo elde etmişlerdir. Ayrıca maksimum rejenerasyon frekansını düşük düzeylerde BA, NAA ve Giberellin içeren rejenerasyon ortamlarından elde etmişlerdir. Winkelmann (2010) tozlanmamış çiçeklere ait ovulleri, 2 mg/l 2,4-D ve 0.8 mg/l 2-iP içeren ½ MS ortamında kültüre alarak embriyo oluşumunu sağlamıştır. Koçak ve ark. (2014), Winkelmann (2010)'nın bildirmiş olduğu protokolü Türkiye'de doğal olarak yetişen *C. persicum* bitkilerinde denemişlerdir. Ovul, ovaryum, yaprak ve yaprak sapı kullanılarak yapılan bu çalışmada da başarılı bir şekilde somatik embriyolar üretilebilmiştir. Prange ve ark. (2010a) üç farklı yabancı siklamen türünde (*Cyclamen graecum* Link, *Cyclamen mirabile* Hildebrand, *Cyclamen trochopteranthum* Schwarz) kallus, süsüpanسیون ve protoplast kültürleri kullanarak yaptıkları somatik embriyogenesis çalışmasında oksin olarak 2,4-D kullanmışlar ve başarılı sonuçlar elde etmişlerdir.

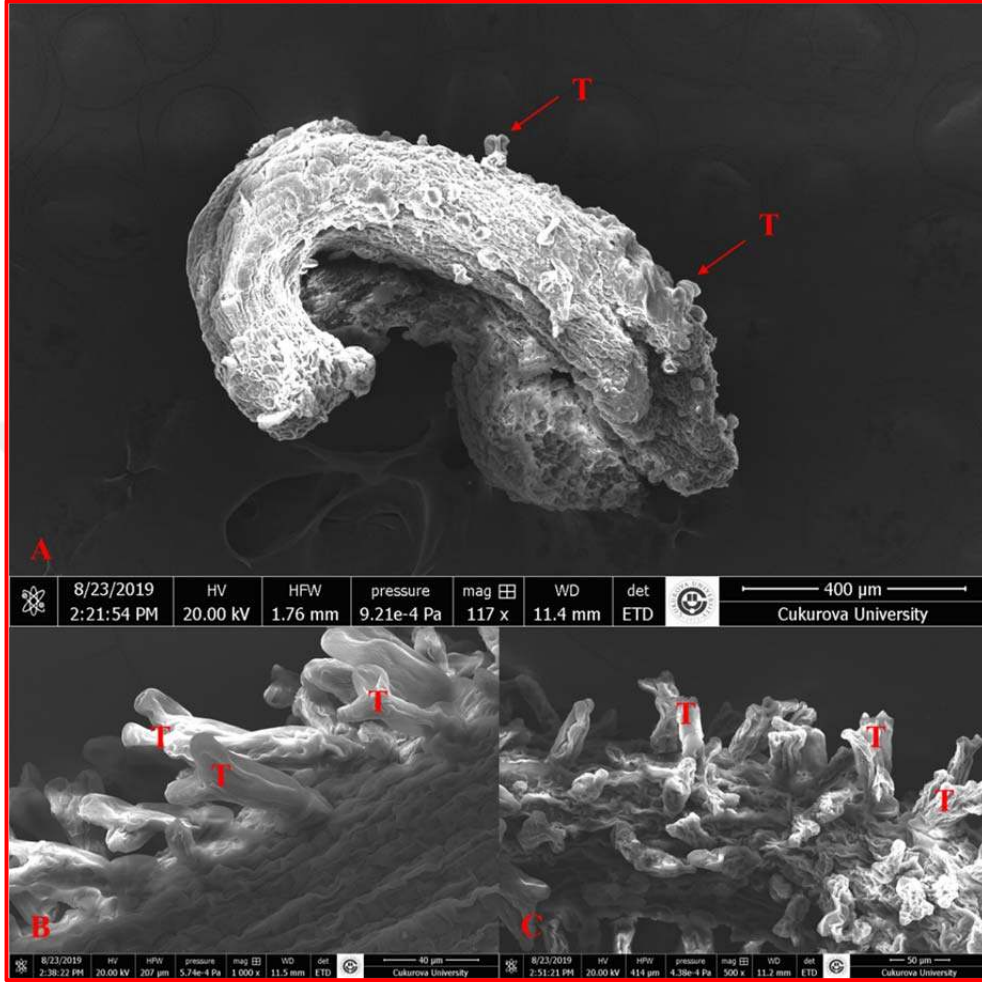
Embriyo gelişiminin farklı aşamaları taramalı elektron mikroskopu ile incelenmiş ve görüntülenmiştir (Şekil 4.16). SEM ile elde edilen görüntüler incelendiğinde kotiledon safhasından itibaren bipolar yapı belirgin bir şekilde görülmeye başlamıştır. Şekil 4.16 (D)'de toprak üstü aksamı oluşturacak olan sürgün (S) kısmı ve toprak altı aksamı oluşturacak kök-yumru (KY) kısmı belirgin bir şekilde birbirinden ayrılarak görülmektedir. Şekil 4.16 (E)'de çimlenme başlangıcında bulunan embriyoda bipolar yapı daha da belirginleşmiştir. Yumru (Y) irileşerek belirmiş ve yumru üzerinde ilk kök (K) oluşumu başlamıştır. Benzer şekilde sürgün uzayarak büyümüş ve uç kısmında sürgün ucu (SU) belirgin bir şekilde görülmüştür.

Farklı aşamalar incelendiğinde, globular ve kalp safhasında doku yüzeylerinde herhangi bir yapılaşmanın oluşmadığı görülmektedir. Ancak torpedo safhasında doku yüzeylerinde çıkıntı şeklinde yapılar oluşmaktadır. Torpedo safhasında oluşmaya başlayan doku yüzeylerindeki yapılar kotiledon safhasında ve çimlenme aşamasında daha da artmaktadır (Şekil 4.17). SEM analizlerinin yanı sıra embriyolar ayrıca stereo mikroskop ile de incelenmiştir. Her iki mikroskop incelemesi sonunda bu yapıların tüycükler olduğu belirlenmiştir.





Şekil 4.16. Embriyo gelişiminin farklı aşamalarının taramalı elektron mikroskobu ile incelenmesi A) globular safha, B) kalp safhası, C) torpedo safhası, D) kotiledon safhası (S; sürgün, KY; kök-yumru), E) çimlenme başlangıcı (S; sürgün, SU; sürgün ucu Y; yumru, K; kök).



Şekil 4.17. Embriyo yüzeylerinde oluşan tüycükler A) Torpedo, B) Kotiledon, C) Çimlenme başlangıcı (T: Tüyçük).

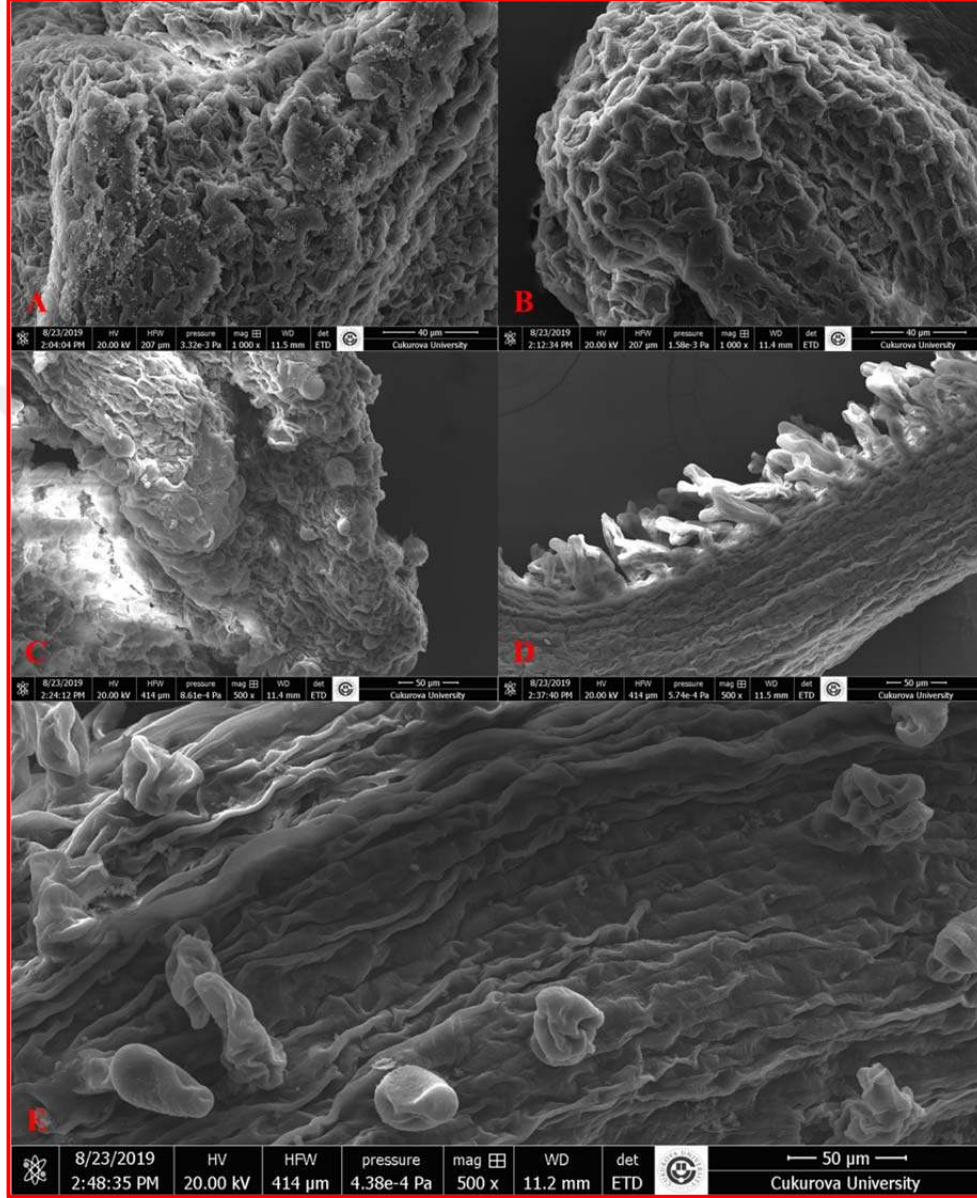
Besin içeriğinin kallus yığınları içerisindeki iletimi, ortam yüzeyine temas eden alt hücrelerden (dokulardan) üst hücrelere (dokulara) doğru olmaktadır. Embriyojenik gelişimin erken safhalarında embriyoların küçük olmaları ve buna bağlı olarak da birbirleri ile temas yüzeylerinin fazla olması nedeni ile bu iletim sistemi bu aşamalarda da devam etmektedir. Ancak embriyoların torpedo safhasından itibaren uzayarak büyümeye başlaması ile birbirleri ile olan temas yüzeyleri azalmakta aynı zamanda duyulan besin miktarı artmaktadır. Bu etmenler

de, embriyolar arasındaki iletim sistemini yetersiz hale getirmektedir. Bu durumda torpedo aşamasından itibaren oluşan tüycüklerin besin alımını arttırmak amacı ile oluşmuş olabilecekleri düşüncesini ön plana çıkarmaktadır.

Embriyoların farklı gelişim aşamaları incelendiğinde, hücre yapılarında farklılıkların olduğu görülmektedir. Globular ve kalp safhada eşboyutlu (boyutları birbirine yakın ölçüde) yapı sergileyen hücreler sonraki safhalarda polar kısımlara (kök-yumru, sürgün) doğru uzamışlardır (Şekil 4.18). Hücrelerin belirtildiği gibi uzaması embriyoların globular safhadan kotiledon safhasına kadar hacimsel olarak büyümesinin hücre bölünmesi ile gerçekleşeceği gibi, hücre büyümesi ile gerçekleşebileceği olasılığını da ön plana çıkarmaktadır. Ancak daha kesin sonuçlar için farklı aşamaların histolojik analiz yapılarak incelenmesi gerekmektedir.

Sıklamen dikotiledon bir bitkidir ve kalp safhasında her iki kanat (kotiledon) görülmektedir (Şekil 4.19, B). Ancak bu kotiledonlardan biri torpedo aşamasında küçülerek dumura uğramaya başlamaktadır (Şekil 4.19, C). Kotiledon safhasında ise tamamen yok olmuştur ve çimlenme aşamasında tek bir kotiledon yaprak ile çimlenme gerçekleşmektedir (Şekil 4.19, D, E). Bu durum Winkelmann (2010) tarafından da daha önce bildirilmiştir.

Somatik embriyolarda çimlenme iki farklı şekilde görülmüştür. İlkinde mikro yumru ve üzerinde kotiledon gelişerek çimlenme tamamlanmıştır. Bu şekilde çimlenen embriyolar sağlıklı bir şekilde gelişerek bitkiciklere dönüşebilmişlerdir. Diğer şekilde embriyo şişerek mikro yumruyu ve kökleri oluşturmuştur. Bu çimlenme şeklinde gelişim daha ileri aşamaya geçememiştir (Şekil 4.20). Benzer şekilde Prange ve ark. (2010b)'da somatik embriyoların iki farklı şekilde çimlendiklerini ve önce kök oluşturan embriyoların daha fazla gelişmediklerini ve önce kotiledon oluşturan embriyoların ise başarılı bir şekilde çimlendiğini bildirmişlerdir.



Şekil 4.18. Farklı gelişim aşamalarındaki hücre yapıları A) Globular, B) Kalp, C) Torpedo, D) Kotiledon, E) Çimlenme.



Şekil 4.19. Embriyo gelişim aşamalarının stereo mikroskop ile incelenmesi A) Globular safha, B) Kalp safhası, C) Torpedo, D) Kotiledon, E) Çimlenme başlangıcı, F) Bütün aşamalar.

Tez çalışmasında tek bir eksplanttan elde edilen embriyo miktarı sayılmıştır. Sayım işleminde farklı embriyo aşamaları ayırt edilmeksizin bütün

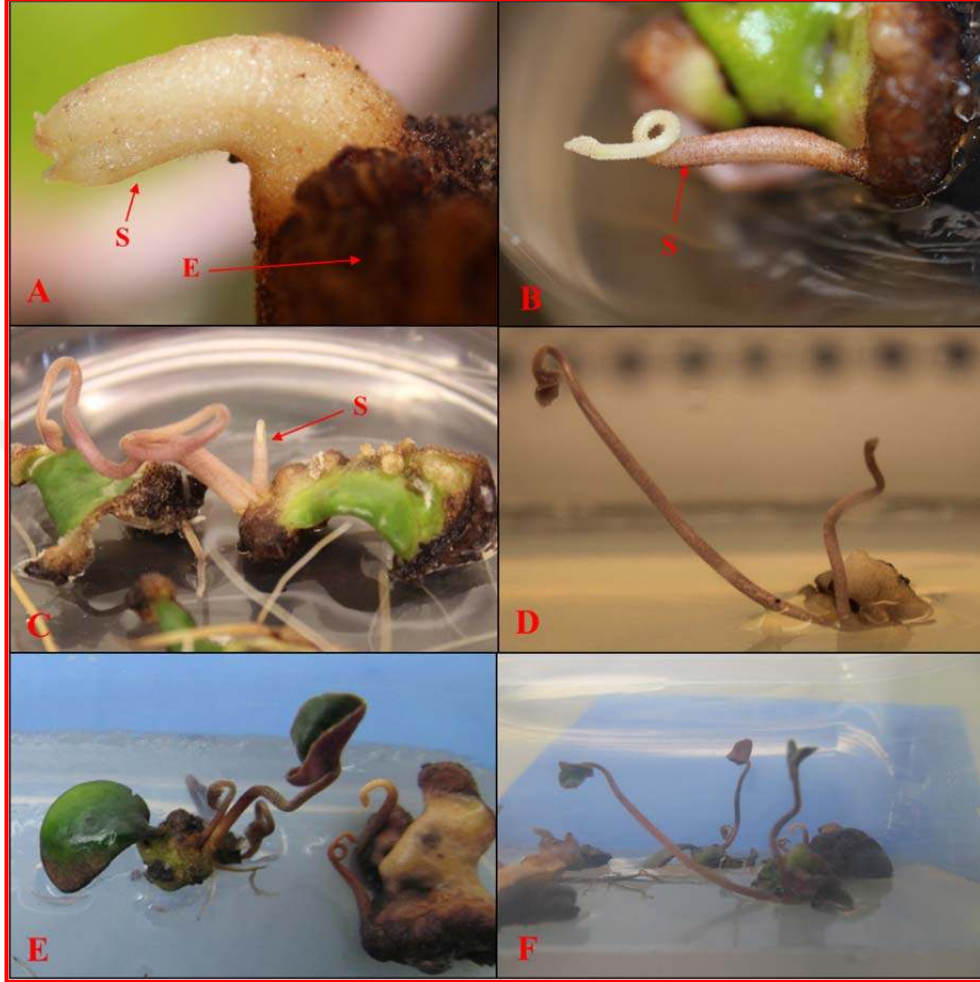
embriyolar sayılmıştır. Sayımlar sonucunda tek bir eksplanttan maksimum 1754 tane embriyo elde edilmiştir. Seyring ve ark. (2009) *C. coum*'da, 11 eksplanttan toplam 462 somatik embriyo benzeri yapı elde etmişlerdir. Bu sayı çalışmamız ile karşılaştırıldığında oldukça yetersiz kalmaktadır. Prange ve ark. (2010b) ise *C. coum*'un protoplast kültürleri ile yapmış oldukları somatik embriyogenesis çalışmasında, 1 gr kallustan 876 adet somatik embriyo elde etmişlerdir.



Şekil 4.20. Somatik embriyoların farklı çimlenme şekilleri A), B) Sadece kök oluşumu (Gelişim göstermeyen çimlenme şekli), C), D) kök ve sürgün oluşumu (Gelişim gösteren çimlenme şekli), (K: Kök, S: Sürgün, Y: Yumru)

Denemede VI'da kullanılan 4 farklı ortamın hepsinde de yaprak eksplantlarından düşük sayıda organogenesis ile bitkicik oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4.21). Yaprak sapı eksplantlarından ise organogenesis oluşumu görülmemiştir. Yaprak eksplantlarında hem somatik embriyogenesis hem de organogenesis olayının görülmesi yaprak eksplantının rejeneratif potansiyelini öne

çıkarmaktadır. Bu rejeneratif potansiyele ayrıca kullanılan eksplantın taze (*in vitro* bitkiciklere ait) olmasının da etki ettiği düşünülmektedir. Yaprak eksplantlarının bu denemede görülen rejenerasyon yeteneği, somatik embriyo üretimi sağlanan diğer bir deneme olan deneme I'de görülmemiştir. Temel sebebi ise sterilizasyon işleminden kaynaklanmaktadır. Tez kapsamında çalışılan *C. coum* türü doğal ortamından alınarak *in vitro* da kültüre alındığı için bünyesinde fazla miktarda enfeksiyon etmeni bulundurmakta ve dolayısı ile sterilizasyon işlemi oldukça zor olmaktadır. Buna bağlı olarak sterilizasyon işleminde kullanılan kimyasalların miktarı ve süresi arttırılmıştır. Kullanılan sterilizasyon yönteminin ağır olması ise eksplantın dokularına zarar verebilmekte ve rejenerasyon yeteneğine doğrudan olumsuz etki yapmaktadır.



Şekil 4.21. Yaprak eksplantlarında organogenesis sonucu bitkicik oluşumu A) Sürgün oluşumu, B) Uzunmuş sürgün; C), D), E), F) Organogenesis sonucu oluşan bitkicikler (S: Sürgün, E: Eksplant).

Deneme VI, Deneme I ile karşılaştırıldığında bazı farklılıkların olduğu gözlemlenmiştir. Bu denemede, embriyo oluşumu kültür başlangıcından itibaren 3 ay sonra başlarken, deneme I'de 5 ay sonra başlamıştır. *In vitro* kültürde muhafaza edilen bitkilerden alınan eksplantların daha çabuk gelişim gösterdiği belirlenmiştir.

Embriyolar çimlendikten sonra büyümeleri yavaşlamış ve yeni yaprakların çıkışı zaman almıştır. Büyümeyi hızlandırmak ve yeni yaprak çıkışlarını arttırmak

amacı ile farklılaştırma ve çimlenme ortamına farklı dozlarda sitokinin eklenerek hazırlanan 3 farklı ortamla (1.ortam: 0.5 mg/l BA, 2. ortam: 0.5 mg/ Kinetin, 3. ortam: 0.5 mg/l BA ve 0.5 mg/l Kinetin) bir deneme kurulmuştur. Deneme sonucunda, kontrol grubu ile sitokininilavesi yapılan ortamlar arasında bitkisel materyalin gelişimi ve yeni yaprak oluşturma zamanı açısından bir farklılık görülmemiştir.

4.8. Bitkiciklerin Dış Ortama Aktarılması

Birkaç yaprak, yumru ve kök oluşturan bitkicikler *in vitro* koşullardan çıkarılarak sera ortamında 1/1 oranında steril torf/perlit içeren viyollere dikilmiştir. Toprağa aktarılan bitkilerden, %82.5'i hayatta kalmıştır. Prange ve ark. (2010a) farklı siklamen türlerinde kallus, süspansiyon ve protoplast kültürleri ile yaptıkları somatik embriyo çalışmasında *Cyclamen mirabile* türünde yakın değerler elde etmişlerdir. Bu çalışmada dış ortama aktarılan bitkilerin %88'i hayatta kalmıştır. İzgü ve ark. (2016) Türkiye'ye endemik 4 siklamen türünde yaptıkları çalışmada farklı türlerde %25 ile %70 arasında değişen hayatta kalma oranları tespit etmişlerdir. Prange ve ark. (2010b) *C. coum*'da protoplast kültüründen elde ettikleri embriyoları 3 farklı gruba ayırarak dış ortama aktarmışlardır. Üç ve daha fazla yaprak içeren embriyoların tamamına yakını hayatta kalırken, yaprak içermeyenlerin %35'i ve kontrol bitkilerinin ise %60'ı hayatta kalmıştır. Seyring ve ark. (2009) *C. coum*'da elde ettikleri somatik embriyo benzeri yapıların yaklaşık %50'sini dış ortama alıştırmayı başarmışlardır. Dış ortama aktarılan bitkilerin sadece %3'ünde anormal fenotip (ototetraploidi) görülmüştür.

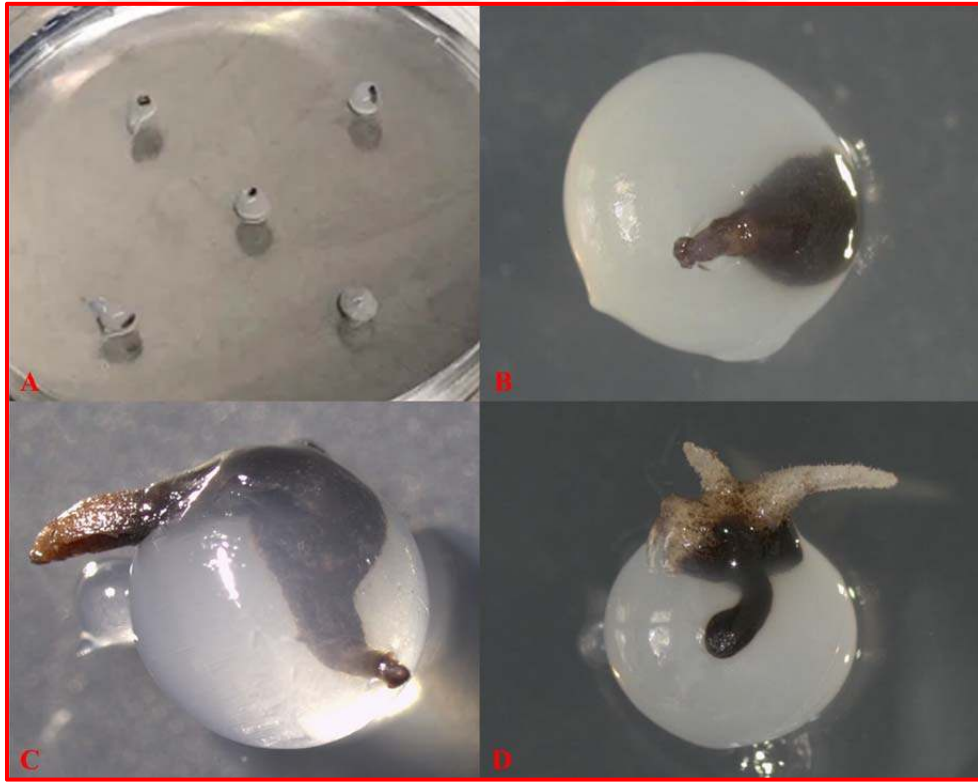
Dış ortama aktarılan bitkicikler arasında morfolojik olarak bir farklılık görülmemiştir (Şekil 4.22).



şekil 4.22. Dış ortama aktarılan bitkiler

4.9. Sentetik Tohum Bulguları

Sentetik tohum üretimi için kurulan denemede 3 farklı ortam (MS, WPM ve ROM) ve her ortam için prolin (1 g/l) ve spermin (0.05 g/l) içeren ve içermeyen kültürler kullanılmıştır. Ayrıca kaplama yapılmayan embriyolar ve jel maddesine besi ortamı eklenen ve eklenmeyen sentetik tohumlar kullanılarak toplamda 18 farklı uygulama denenmiştir. Kaplama yapılarak kültüre alınan embriyolarda ilk haftadan itibaren irileşme gözlenmiştir. Irileşme ile birlikte embriyoların tamamında kararma meydana gelmiştir. İlk haftadan sonra embriyolarda kök oluşumları başlamıştır. Ancak hiçbir uygulamada şu ana kadar bitkiye dönüşüm görülmemiştir.



Şekil 4.23. Sentetik tohumların gelişim aşamaları A) Sentetik tohumların çimlendirme ortamında kültüre alınması, B) Embriyonun kapsül içerisinde uzaması, C, D) embriyonun uzayarak kapsül dışına çıkışı.

Denemede kaplanarak ya da çıplak olarak kültüre alınan somatik embriyolardan, değişen oranlarda (Çizelge 4.6) somatik embriyo oluşumu görülmüştür.

Çizelge 4.6. Sentetik tohum denemesinde elde edilen embriyo oluşum oranları

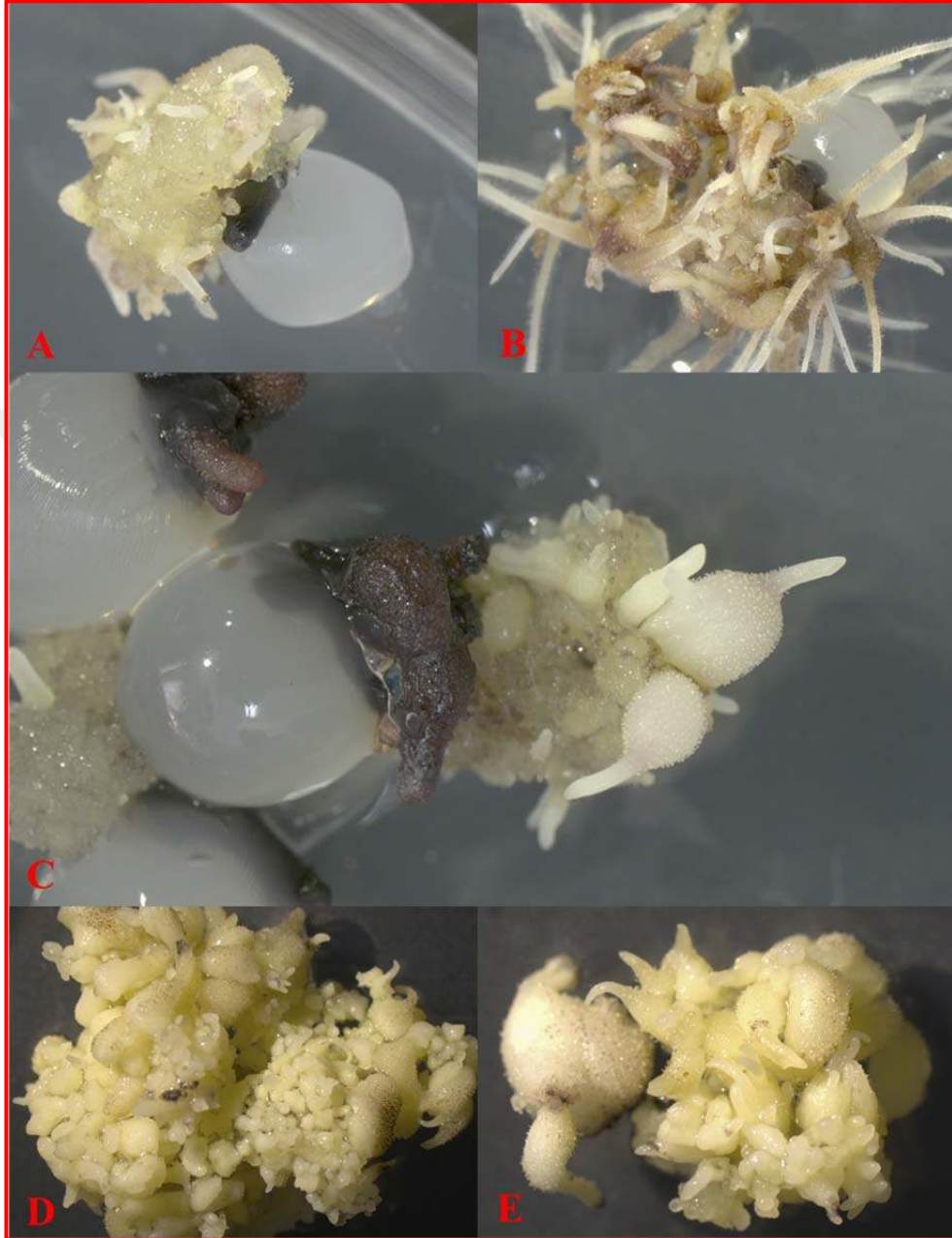
	Uygulama				Embriyo yüzdesi
	Çimlendirme ortamı	Prolin, Spermin	Besi ortamı (kapsül içinde)	Kapsül	
1	MS	+	+	+	4.7 ef (7.4)
2	MS	-	+	+	12.2 ef (16.8)
3	MS	+	-	+	0 f (0)
4	MS	-	-	+	13.3 def (17.7)
5	MS	+	-	-	53.3 bc (46.9)
6	MS	-	-	-	66.6 ab (60)
7	WPM	+	+	+	0 f (0)
8	WPM	-	+	+	6.6 ef (8.8)
9	WPM	+	-	+	0 f (0)
10	WPM	-	-	+	13.3 ef (13.1)
11	WPM	+	-	-	93.3 a (81.1)
12	WPM	-	-	-	46.6 bcd (43.1)
13	ROM	+	+	+	0 f (0)
14	ROM	-	+	+	0 f (0)
15	ROM	+	-	+	0 f (0)
16	ROM	-	-	+	0 f (0)
17	ROM	+	-	-	26.6 cde (25)
18	ROM	-	-	-	33.3 cde (30)

LSD= 25.77, (p<0.05)

Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlere açı transformasyonu uygulanmış değerlerdir. Farklı harfler farklılıkları belirtmektedir

Test edilen 18 farklı uygulamanın 7 tanesinde embriyo oluşumu görülmezken, 11 tanesinde embriyo oluşumu görülmüştür (Şekil 4.24). Embriyo oluşum oranları %4.7 ile %93.3 arasında değişim göstermiştir. Elde edilen embriyo oluşum oranları arasındaki farklar istatistiki açıdan önemli bulunmuştur. En yüksek embriyo oluşum oranı %93.3 ile kapsüllenmemiş embriyoların prolin ve spermin içeren WPM’de kültüre alındığı uygulamadan elde edilmiştir. İkinci en yüksek oran ise kapsüllenmemiş embriyoların prolin ve spermin içeren MS ortamında kültüre alındığı uygulamadan elde edilmiştir. Diğer yüksek orana sahip uygulamalar incelendiğinde, kapsüllenmemiş somatik embriyoların kullanıldığı uygulamaların olduğu görülmektedir. Kapsüllenmiş embriyolardan somatik embriyo oluşum oranlarının ise daha düşük olduğu anlaşılmaktadır.

Prolin ve spermidin içeren ve içermeyen uygulamalar karşılaştırıldığında, MS ortamında embriyo oluşum oranlarının prolin ve spermin içeren uygulamalarda daha yüksek olduğu görülmektedir. WPM’nin kullanıldığı uygulamalarda prolin ve spermin varlığı kapsüllenmiş embriyolarda embriyo oluşum oranını arttırırken, kapsüllenmemiş embriyolarda düşüşe neden olmuştur. ROM kullanılan ortamlarda ise önemli bir değişikliğe sahip olmamıştır.



Şekil 4.24. Sentetik tohum denemesinden elde edilen somatik embriyolar A,B,C) Kapsüllenmiş embriyolardan somatik embriyo oluşumu, D,E) Kapsüllenmemiş embriyolardan somatik embriyo oluşumu.

Cyclamen cinsinde daha önceden yapılmış iki farklı sentetik tohum çalışması bildirilmiştir. İlk çalışmada Winkelmann ve ark., (2004) *C. persicum*'da klasik aljinat kapsülasyon ve aljinat oluklu tanecik tekniğini test etmişlerdir. Çalışmada globular safhadaki embriyolar kullanılmış ve klasik aljinat tekniği ile üretilen sentetik tohumlar %97 oranında çimlenme başarısı gösterirken oluklu tanecik tekniği ile üretilen sentetik tohumlar %7 oranında çimlenme göstermiştir. Diğer çalışmada Hohe ve ark., (2005) *C. persicum*'a ait torpedo aşamasındaki somatik embriyoların sentetik tohum üretimi için kurumaya karşı göstermiş oldukları toleransı test etmişlerdir. Kurutularak elde edilen sentetik tohumların %28'i çimlenme başarısı göstermiştir.

Yapılan tez çalışmasında kapsüllenene embriyolardan direkt olarak gelişim sağlanamamış olup, yeni oluşan somatik embriyoların bitkiye dönüşme kapasitesi bulunmaktadır. Kapsülleneerek elde edilen sentetik tohumlardaki çimlenme sorununun, kaplama yapılan embriyoların bulundukları aşamaya ve fizyolojik durumlarına bağlı olabileceği düşünülmektedir. Sentetik tohum denemesinde torpedo ve kotiledon aşamasındaki embriyolar kapsüllenmiştir. Bu aşamalarındaki somatik embriyolar bireysel olarak kültüre alındıklarında genel olarak kararmakta ve embriyo gelişimi olumsuz etkilenebilmektedir. Çimlenme başlangıcından itibaren bireysel olarak kültüre alınmaya başlayan embriyolar bitkiye dönüşmekte daha başarılı olmaktadır. Bu bakımdan çimlenme başlangıcındaki safhadaki embriyoların kapsüllenmesi ile elde edilen embriyoların çimlenme başarısı gösterebileceği düşünülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ülkemiz, bulunduğu coğrafik konum ve farklı iklim faktörlerinin etkisi ile oldukça geniş bir biyoçeşitliliğe sahiptir. Ayrıca 3 farklı gen merkezinin (Avrupa, Sibirya, İran-Turan, Akdeniz) kesişim noktasında bulunması bu çeşitliliği daha da arttırmaktadır. Ülkemiz sadece barındırdığı doğal bitki türleri anlamında değil aynı zamanda endemik türler açısından da oldukça geniş bir biyoçeşitliliğe sahiptir. Endemik bitkiler toplam bitkilerin yaklaşık üçte birini oluşturmaktadır.

Yumru, rizom ve soğan gibi toprak altı depo organlarına sahip geofit olarak bilinen bitkiler mevcut biyoçeşitliliğimize önemli katkı sağlamaktadır. Ülkemizde doğal olarak yetişen en önemli geofitlerden biri siklamen bitkisidir. Siklamen bitkisinin 6 türü endemik olmak üzere toplamda 10 türü ülkemizde doğal olarak yetişmektedir (*C. persicum*, *C. pseudibericum*, *C. coum*, *C. parviflorum*, *C. inteminatum*, *C. trocopteranthum*, *C. hederifolium*, *C. cilicium*, *C. mirabile* ve *C. greacum*). Ülkemizde çok sayıda siklamen türünün doğal olarak yetişmesi, özellikle de endemik türlerin bulunması siklamen açısından önemli bir genetik kaynağa sahip olduğumuzu göstermektedir. Kültürü yapılan bitkilerin doğal formlarının bulunması bir ülke için eşsiz kaynaklardan birisidir. Doğal olarak yetişen bitkiler, ıslah sürecinde başlangıç materyali olarak kullanılabilir. Ayrıca iyileştirilmesi düşünülen genotiplerde bulunmayan özellikleri belirleyen genleri (hastalıklara ve zararlılara tolerans/dayanıklılık, soğuğa tolerans, renk v.s.) içermekte ve bu özellikler diğer bitkilere melezleme ile aktarılabilir.

Ticari olarak en çok kültürü yapılan siklamen türü, *C. persicum*'dur. Ancak diğer siklamen türleri de farklı özellikleri ile değerlidir. *C. coum* türünün soğuğa toleransı *C. persicum* türünden daha fazladır. Özellikle soğuk iklime sahip olan Avrupa ülkeleri soğuğa toleransı olan siklamen çeşitlerini talep etmektedir. Bu bağlamda, *C. coum* türü ön plana çıkmaktadır.

Bitki genetik kaynakları açısından oldukça zengin olmamıza rağmen, ıslah materyali konusunda dışa bağımlılığımız devam etmektedir. Dışa bağımlılığı sona

erdirmek için ülkemizde doğal olarak yetişen genetik kaynakları koruma ve çoğaltma yöntemlerini ve bu kaynakları kullanarak piyasa koşullarında rekabet edebilecek çeşitleri geliştirmek gerekmektedir. Siklamen türlerindeki çoğaltım sorunları dikkate alındığında, biyoteknolojik yöntemlerin kullanılması önemli bir alternatif olarak karşımıza çıkmaktadır.

Somatik embriyogenesis, doku kültüründe kullanılan etkili bir çoğaltma tekniğidir. Bu yöntemle elde edilen embriyolar sadece çoğaltım amacı ile kullanılmayıp aynı zamanda genetik kaynakların muhafazası içinde kullanılmaktadır.

Bu sebeplerle yapılan bu tez çalışmasında ülkemizde doğal yayılış gösteren *C. coum* türünde somatik embriyogenesis yöntemi kullanılarak bu türde somatik embriyoların elde edilmesi ve elde edilen somatik embriyoların kaplanarak sentetik tohumların üretilmesi amaçlanmış ve elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde verilmiştir.

- Tez çalışmasında kullanılan eksplantların sterilizasyonu için farklı yöntemler denenmiş ve enfeksiyon sorunu ile karşılaşmıştır. Sonuç olarak sırası ile antibakteriyel sabun ile yıkama, 20 dk. musluk suyunda bekletme, %0.1 HgCl₂'de 25 dk. bekletme, %70 etil alkolde 1.5 dakika bekletme, %30 Domestos®'da 25 dakika bekletme işlemlerinden oluşan sterilizasyon yöntemi kullanılarak denemeler kurulmuştur. Bu sterilizasyon yönteminde kültürün erken safhalarında enfeksiyon oluşumuna rastlanmazken, tekrar eden alt kültürler sonrasında enfeksiyon oluşumu görülmüştür. *C. coum* türünde yapılacak çalışmalarda enfeksiyon oluşumunu önlemek için tohumdan çimlendirme yapılarak steril eksplantların kullanılması ya da besi ortamına enfeksiyon etmenlerini engelleyici maddelerin eklenmesi önerilmektedir.
- Embriyojenik kallusların oluşumunu uyarmak için NAA, BA ve Kinetinin farklı kombinasyon ve konsantrasyonundan oluşan 24 farklı besi ortamı

kullanılmıştır. Bu ortamlardan 8 tanesinde (1 mg/l NAA + 2 mg/l BA, 2 mg/l NAA + 1.5 mg/l BA, 2 mg/l NAA + 2 mg/l BA, 2.5 mg/l NAA + 0.5 mg/l BA, 2.5 mg/l NAA + 1 mg/l BA, 2.5 mg/l NAA + 1.5 mg/l BA, 2 mg/l NAA + 1 mg/l Kinetin ve 2 mg/l NAA + 2 mg/l Kinetin) embriyo oluşumu görülmüştür.

- Winkelmann ve ark. (2010)'nın *C. persicum* için geliştirdiği protokol ($\frac{1}{2}$ MS besiyeri ve BBD olarak 2 mg/l 2,4-D ve 0,8 mg/l 2IP) ve bu protokolün modifiye edilmiş hali (1 mg/l 2,4-D + 0,4 mg/l 2-iP içeren $\frac{1}{2}$ MS ve 2 mg/l 2,4-D + 0,8 mg/l 2IP ful MS) kullanıldığında kallus oluşumu görülmüştür. Ancak kallus oluşumu sınırlı kalmış ve herhangi bir embriyo oluşumu görülmemiştir.
- Eksplantlar sterilizasyon işleminden sonra besi ortamı içerisinde 1 ay süre ile 4°C'de soğuk uygulamasına maruz bırakıldıktan sonra büyütme odasında kültüre alındığında kallus oluşumu gerçekleşmiştir. Ancak soğuk uygulamasının embriyo oluşumu üzerine olumlu etkisi gözlenmemiştir.
- Yaprak sapları oval şekilde ince diskler halinde kesilerek kültüre alınmıştır. Bu eksplantlardan zayıf kallus oluşumu gerçekleşirken, embriyo oluşumu görülmemiştir.
- *In vitro* koşullarda elde edilen bitkilerden alınan yaprak ve yaprak sapı eksplantları, 4 farklı besi ortamında (2 mg/l NAA + 1 mg/l BA, 2 mg/l NAA + 2 mg/l BA, 2 mg/l NAA + 1 mg/l Kinetin, 2 mg/l NAA + 2 mg/l Kinetin) kültüre alınmıştır. Bütün besi ortamlarında da embriyojenik kallus ve somatik embriyo oluşumu görülmüştür. Bu besi ortamlarında ayrıca az sayıda organogenesis oluşumu da görülmüştür. Kullanılan BBD oranları değiştirilerek bu türde organogenesis protokolü geliştirilebilir.
- Tek bir eksplanttan 1750'nin üzerinde embriyo üretimi sağlanmıştır.
- Embriyolar çimlenip bir iki yaprak oluşturduktan sonra gelişimleri yavaşlamıştır. Bu nedenle besi ortamına farklı BBD maddeler ya da

destekleyici besinler eklenerek büyümeyi arttıran protokollerin geliştirilmesi önerilmektedir.

- Tez çalışmasında yüksek miktarlarda somatik embriyo elde edilmiştir. Bu embriyoların klasik yarı katı besi ortamlarında kültürü oldukça emek yoğun bir işlemdir. Ayrıca yarı katı kültür sisteminde kültüre alınan eksplantlar eşit şekilde ve homojen olarak besi içeriğine ulaşamamaktadır. Bu sebeplerden dolayı embriyo üretiminde biyoreaktör sistemlerinin optimize edilerek kullanılması önerilmektedir.
- *In vitro* koşullarda elde edilen bitkiler, dış ortama başarılı bir şekilde aktarılmıştır ve aktarılan bitkilerin %82.5'i hayatta kalmıştır.
- Kurulan sentetik tohum denemesinde 16 farklı uygulama denenmiş ancak çimlenme sağlanamamıştır. Ancak yeni somatik embriyoların oluşumu gözlenmiştir. Farklı aşamalardaki somatik embriyoların kaplanarak yeni denemelerin kurulması önerilir.

KAYNAKLAR

- Abu-Qaoud, H., 2004. Direct regeneration in *Cyclamen persicum* Mill. using seedling tissues. An-Najah Univ J Res (Nat Sci) 18:147–156.
- Ahmed, MR., Anis, M., Al-Etta, HA., 2014. Encapsulation technology for short-term storage and germplasm exchange of *Vitex trifolia* L. Rend. Fis. Acc. Lincei.
- Aida, R., Hirose, Y., Kishimoto, S., Shibata, M., 1999. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of *Cyclamen persicum* Mill. Plant Sci 148:1–7.
- Ara, H., Jaiswal, U., Jaiswal, VS., 2000. Synthetic seed: Prospects and limitations. Current Science, VOL. 78, NO. 12.
- Arslan, N., Baydar, H., Kızıl, S., Karık, Ü., Şekeroğlu, N. Gümüştü, A., 2015. Tıbbi Aromatik Bitkiler Üretiminde Değişimler ve Yeni Arayışlar. Ziraat Mühendisliği VIII. Teknik Kongresi Bildiriler Kitabı-1, 483-507.
- Avcı, M., 2005. Çeşitlilik ve endemizm açısından Türkiyenin bitki ötrüsü. İstanbul Üniversitesi Edebiyat Fakültesi Coğrafya Bölümü Coğrafya Dergisi, sayı 13, 27-55. İstanbul.
- Avcu, C., 2011. Katra Dağı (Çanakale/Bayramiç) ve Çevresindeki Geofit Bitkiler Üzerinde Morfolojik ve Ekolojik Çalışmalar. Balıkesir Üniversitesi Fen-Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı. 157 s.
- Bach, A., Malik, M., Zolneczek, B., (1998). Organogenesis and somatic embryogenesis in cultures of *Cyclamen persicum* Mill. F-1 'medium'. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica. 40: 47-51.
- Baskaran, P., Kumari, A., Staden, JV., 2015. Embryogenesis and synthetic seed production in *Mondia whitei*. Plant Cell Tiss Organ Cult (2015) 121:205–214.

- Baskaran, P., Kumari, A., Staden, JV., 2017. *In vitro* propagation via organogenesis and synthetic seeds of *Urginea altissima* (L.f.) Baker: a threatened medicinal plant. 3 Biotech
- Baskaran, P., Staden, JV., 2017. Ultrastructure of somatic embryo development and plant propagation for *Lachenalia montana*. South African Journal of Botany 109 (2017) 269–274.
- Bayrak Özbucak, T., Ergen Akçin, Ö., Polat, G., 2017. Aynı ortamda yayılış gösteren bazı geofit bitkiler üzerine ekolojik bir çalışma. Ordu Üniv. Bil. Tek. Derg., Cilt:7, Sayı:1.
- Bektaş, E., and Sökmen, A., 2016. *In vitro* seed germination, plantlet growth, tuberization, and synthetic seed production of *Serapias vomeracea* (Burm.f.) Briq. Turk J Bot 40: 584-594 © TÜBİTAK.
- Bhattacharyya, P., Kumar, V., Staden, JV., 2018. *In vitro* encapsulation based short term storage and assessment of genetic homogeneity in regenerated *Ansellia africana* (Leopard orchid) using gene targeted molecular markers. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)133:299–310.
- Bian, F., You, CR., Gong, XQ., Qu, FN., 2008. Induction of embryogenic callus and somatic embryogenesis from the tubers of seedlings in *Cyclamen persicum* Mill. J Yantai Univ 21:281–285.
- Bian, F., Zheng, C., Qu, F., Gong, X., You, C., 2010. Proteomic analysis of somatic embryogenesis in *Cyclamen persicum* Mill. Plant Mol Biol Rep 28(1):22–31.
- Bossard, R., 1960. Culture Florales. 19, rue Hautefeuille, Crops. In: Plant Germplasm Conservation: Perspectives for the 2000, PARIS, 83–99.
- Boztok, Ş., 2002. Siklamen (*Cyclamen persicum*)’de Çiçeklenme Üzerine Giberelik Asitin Etkisi. Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg., 39 (3): 1-8 ISSN 1018-8851.
- Bürün, B., Şahin, O., 2009. *In vitro* and in vivo germination of *Cyclamen alpinum* seeds. Turk J Bot 33 277-283 © TÜBİTAK.

- Cangahuala-Inocente, GC., Dal Vesco, LL., Steinmacher, D., Torreos, AC., Guerra, MP., 2007. Improvements in somatic embryogenesis protocol in Feijoa (*Acca sellowiana* (Berg) Biuret). Induction, conversion and synthetic seeds. *Sci Hort* 111:228-234.
- Cartes, P., Castellano, H., Ríos, D., Sáez, K., Spierccolli, S., Sánchez, M., 2009. Encapsulated somatic embryos and zygotic embryos for obtaining artificial seeds of rauli-beech (*Nothofagus alpina* (Poepp. & Endl.) oerst.). *Chil. J. Agric. Res.* 69, 112–118.
- Çakır EA., 2017. Geophytes of Iğdır (east anatolia) and their economic potentialities as ornamental plant. *Eurasian Journal of Forest Science* 5(1): 48-56.
- Çelik, A., Çiçek, M., Semiz, G., Karıncalı, M., 2003. Taxonomical and Ecological Investigations on Some Geophytes Growing Around Denizli Province (Turkey). *Turk J Bot* 28 (2004) 205-211.
- Çetık, R., 1973. “Vejetasyon Bilimi” Ülkemiz Matbaası, Ankara.
- Çölgeçen, H., Toker, MC., 2006. Sentetik tohum. *Anadolu University Journal of Science And Technology Cilt/Vol.:7-Sayı/No: 2 : 323-336.*
- Çürük, P., 2013. Adana ve Çevresinde Doğal Olarak Yetişen Siklamen Türlerinin Morfolojik Ve Moleküler Karakterizasyonu. *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tez*, 216.
- Çürük, P., 2017. Impact of tuber location on morphological Characteristics of *Cyclamen*. *Pak. J. Bot.*, 49(1): 317-324.
- Dallman, P.R., 1998. *Plant Life in The World's Mediterranean Climates*. Univ. of Calif. Press, Berkeley.
- Dantu, PK., Tomar, UK., 2010. Somatic Embryogenesis. In book: *Cellular and Biochemical Science*, Editors: G. Tripathi. Edition: First. Publisher: I.K. International House Pvt Ltd New Delhi .

- Deo, PC., Tyagi, AP., Taylor, M., Harding, R., and Becker, D., 2010. Factors affecting somatic embryogenesis and transformation in modern plant breeding. *The South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences*, 28, 27-40.
- Dillen, W., Dijkstra, I., Oud, J., 1996. Shoot regeneration in long-term callus cultures derived from mature flowering plants of *Cyclamen persicum* Mill. *Plant Cell Rep* 15:545–548.
- Ekim, T., Koyuncu, M., Güner, A., Erik, S., Yıldız, B., Vural, M., 1991. Türkiye'nin Ekonomik Değer Taşıyan Geofitleri Üzerinde Taksonomik ve Ekolojik Araştırmalar. T.C. Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı Orman Genel Müdürlüğü, İşletme ve Pazarlama Daire Başkanlığı, O. E. M. Eğitim Dairesi Başkanlığı Yayın ve Tanıtma Şube Müdürlüğü Matbaası, Ankara.
- Emek, Y., and Erdağ, B. 2007. Somatic embryogenesis from leaf explants of *Gladiolus anatolicus* (Boiss.) Stapf. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 10(8):1190-4.
- Fascetti, S., Potenza, G., Castronuovo, D., Candido, V., 2014. Wild geophytes of ornamental interest in the native flora of southern Italy. *Italian Journal of Agronomy*; volume 9:595.
- Gantait, S., and Sinniah, UR., 2013. Storability, post-storage conversion and genetic stability assessment of alginate-encapsulated shoot tips of monopodial orchid hybrid *Aranda* Wan Chark Kuan 'Blue' x *Vanda coerulea* Griff. ex. Lindl. *Plant Biotechnol Rep.* 7:257–266.
- Gantait, S., Bustam, S., Sinniah, UR., 2012. Alginate-encapsulation, short-term storage and plant regeneration from protocorm-like bodies of *Aranda* Wan Chark Kuan 'Blue' x *Vanda coerulea* Griff. ex. Lindl. (Orchidaceae). *Plant Growth Regul.*
- Gantait, S., Kundu, S., Ali, N., Sahu, NC., 2015. Synthetic seed production of medicinal plants: a review on influence of explants, encapsulation agent and matrix. *Acta Physiol Plant.* 37:98.

- Geier, T., 1977. Morphogenesis and plant regeneration from cultured organ fragments of *Cyclamen persicum*. Acta Horti 78(167–174):1977.
- Gou, L.H., Shi, T.W., Han, B., 2008. Study on callus inducement and antibrowning of *Cyclamen persicum* Mill [J]. Anim Husb Feed Sci 4:24.
- Grey-Wilson, C., 1988. The Genus Cyclamen. Timber Press, Portland.
- Grzegorzczak, I., and Wysokińska, H., 2011. A protocol for synthetic seeds from *Salvia officinalis* L. shoot tips. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica 53/1: 80–85.
- Gündoğan, M.T., 2003. *Cyclamen mirabile* Hildebr. ve *Cyclamen trochopteranthum* O. Schwarz Türleri Üzerinde Bazı Fitokimyasal Araştırmalar. Muğla Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- Güner, A., 1994. Bitkiler Dünyası Bilim ve Teknik, TÜBİTAK Yayını, Cilt: 27; Sayı 321. Pro-Mat Basın Yayın A. Ş., Ankara.
- Haque, S.M., and Ghosh, B., 2014. Somatic embryogenesis and synthetic seed production-a biotechnological approach for true-to-type propagation and *in vitro* conservation of an ornamental bulbaceous plant *Drimiopsis kirkii* Baker. Appl Biochem Biotechnol, 172:4013–4024.
- Haque, S.M., and Ghosh, B., 2016. High-frequency somatic embryogenesis and artificial seeds for mass production of true-to-type plants in *Ledebouria revoluta*: an important cardioprotective plant. Plant Cell Tiss Organ Cult. 127:71–83.
- Haque, S.M., and Ghosh, B., 2017. Regeneration of cytologically stable plants through dedifferentiation, redifferentiation, and artificial seeds in *Spathoglottis plicata* Blume (Orchidaceae). Horticultural Plant Journal, 3 (5): 199–208.
- Hohe, A., Winkelmann, T., Schwenkel, H.G., 1999. CO₂ accumulation in bioreactor suspension cultures of *Cyclamen persicum* Mill. and its effect on cell growth and regeneration of somatic embryos. Plant Cell Reports. 18(10):863-867.

- Hohe, A., Winkelmann, T., Schwenkel, H.G., 2001. Development of somatic embryos of *Cyclamen persicum* Mill. in liquid culture. *Gartenbauwissenschaft*. 66(5): 219- 224. ISBN 2-85206- 678-5.
- Ishizaka, H., Uematsu, J., 1993. Production of Plants from Pollen in *Cyclamen persicum* Mill. Through Anther Culture. *Japanese Journal of Breeding*, 43 (2), 207-218.
- Ishizaka, H., 2008. Interspecific hybridization by embryo rescue in the genus *Cyclamen*. *Plant Biotechnol* 25(6):511–519.
- Ishizaka, H., Uematsu, J., 1992. Production of interspecific hybrids of *Cyclamen persicum* Mill. and *C. hederifolium* Aiton. by ovule culture. *Jpn J Breed* 42:353–366.
- Ishizaka, H., Uematsu, J., 1995. Interspecific hybrids of *Cyclamen persicum* Mill. and *C. purpurascens* Mill. produced by ovule culture. *Euphytica* 82:31–37.
- İzgü, T., Sevindik, B., Çürük, P., Şimşek, Ö., Aka Kaçar, Y., da Silva, J.A.T., Mendi, Y.Y., 2016. Development of An Efficient Regeneration Protocol for Four *Cyclamen* Species Endemic to Turkey. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 127 (1), 95-113.
- Jalali, N., Naderi, R., Babalar, M., Mirmasoumi, M., 2010. Somatic embryogenesis in *Cyclamen* with two explants and combinations of plant growth regulators. *Hortic Environ Biotechnol* 51:445–448.
- Karam, NS., Al-Majathoub, M., 2000a. Direct shoot regeneration and microtuberization in wild *Cyclamen persicum* Mill. Using seedling tissue. *Sci Hortic* 86:235–246.
- Karam, NS., Al-Majathoub, M., 2000b. *In vitro* shoot regeneration from mature tissue of wild *Cyclamen persicum* Mill. *Sci Hortic* 86:323–333.
- Kiviharju, E., Tuominen, U., Toïrmala, U., 1992. The effect of explant material on somatic embryogenesis of *Cyclamen persicum* Mill. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 28:187–194.

- Koçak, M., 2012. Siklamen (*Cyclamen persicum*)’de Somatik Embriyogenesinin Optimizasyonu. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 53.
- Koçak, M., İzgü, T., Sevindik, B., Tutuncu, M., Çürük, P., Şimşek, O., Aka Kaçar, Y., Teixeira da Silva, J.A., Mendi, Y.Y., 2014. Somatic Embryogenesis of Turkish *Cyclamen persicum* Mill. Sci Hort., 172, 26–33.
- Koyuncu, M., Alp, Ş., 2014. New Geophyte Taxa Described From Turkey At Last Decade. YYU J AGR SCI) 24(1): 101-110.
- Krueger, N., low, C., Donachie, W., 1995. Phenotypic characterization of the cells of the inflammatory response in ovine encephalitic listeriosis. J.Comp.Path., 113, 263-275.
- Kulus, D., Zalewska, M., 2014. Cryopreservation as a tool used in long-term storage of ornamental species—a review. Scientia Horticulturae 168, 88-107.
- Laura, M., De Benedetti, L., Bruna, S., Burchi, G., Berio, T., Giovannini A., Ruffoni B., 2003. *Cyclamen Persicum* Mill.: Somatic Embryogenesis and RAPD Analysis of Embryogenic Callus. Proc. XXVI IHC Biotechnology in Hort. Crop Improvement Eds. F.A. Hammerschlag and P. Saxena Acta Hort. 625, ISHS.
- Li, X., Han J-D., Fang. Y-H., Bai, S-N., and Rao, G-Y., 2017. Expression Analyses of Embryogenesis-Associated Genes during Somatic Embryogenesis of *Adiantum capillus-veneris* L. *In vitro*: New Insights into the Evolution of Reproductive Organs in Land Plants. Front. Plant Sci., 27.
- Lloyd, G. and B.H. McCown. 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. Int. Plant Prop. Soc., Comb. Proc., 30: 421-427.
- Loewenberg, JP., 1969. *Cyclamen* callus culture. Can J Bot 47:2065–2067.

- Lyngved, R., 2008. Somatic embryogenesis in *Cyclamen persicum*. Thesis for the degree of Philosophiae Doctor. Norwegian University of Science and Technology Faculty of Natural Sciences and Technology Department of Biology.
- Lyngved, R., Renaut, J., Hausman, JF., Iversen, TH., Hvoslef-Eide, AK., 2008. Embryo-specific proteins in *Cyclamen persicum* analyzed with 2-D DIGE. J Plant Growth Regul 27(4):353–369.
- Magray, MM., Wani, KP., Chatto, MA., Ummayah, HM., 2017. Synthetic seed technology. Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci 6(11): 662-674.
- Mahendran, G., 2014. Encapsulation of protocorm of *Cymbidium bicolor* Lindl. for short-term storage and germplasm exchange. Journal of Ornamental Plants, Volume 4, Number 4: 17-27.
- Maqsood, M., Mujib, A., Khusrau, M., 2015. Preparation and low temperature short-term storage for synthetic seeds of *Caladium bicolor*. Not Sci Biol, 7(1):90-95.
- Mohammadi, M., Khalighi, A., Naderi, R., Ebrahimie, E., and Sardari, M., 2007. Indirect somatic embryogenesis from petal explant of endangered wild population of *Fritillaria imperialis*. Pakistan Journal of Biological Sciences 10(11):1875-9.
- Mohannad, AM., and Karam NS., 2000. *In vitro* propagation of wild *Cyclamen persicum* Mill. From seedling tissue. Acta Hort. 530, 243-252.
- Mohanty, P., Das, J., 2013. Synthetic seed technology for short term conservation of medicinal orchid *Dendrobium densiflorum* Lindl. Ex Wall and assessment of genetic fidelity of regenerants. Plant Growth Regul, 70:297–303.
- Murashige, T., 1977. Plant cell and organ cultures as horticultural practices. Acta Horticult;78:17–30,

- Mwangia JW., Rodea C., Colditza, F., Haasea, C., Brauna, H-P., Winkelmann, T., 2013. Proteomic and histological analyses of endosperm development in *Cyclamen persicum* as a basis for optimization of somatic embryogenesis. *Plant Science* 201– 202 52– 65.
- Naderi, R., Jalali, N., Babalar, M., Mirmasoumi, M., 2012. Estimate of callus induction and somatic embryogenesis in *Cyclamen*. *Int J Agric Crop Sci* 4(11):699–702.
- Nagesh, KS., Shanthamma, C., Bhagyalakshmi, N., 2009. Role of polarity in de novo shoot bud initiation from stem disc explants of *Curculigo orchoides* Gaertn. and its encapsulation and storability. *Acta Physiol Plant* (2009) 31:699–704.
- Nasırcılar AG., 2016. Potansiyel süs bitkisi olan endemik geofitlerin mikroçoğaltımı. VI. Süs Bitkileri Kongresi, 19-22 Nisan, Antalya.
- Nhut, DT., Tran, H., Thu, M., Van, B., 2012. Thin cell layer technology in regeneration and micropropagation of *Cyclamen persicum* Mill. *Propag Ornament Plants* 12(2):89–95.
- Nongdam, P., 2016 Development of synthetic seed technology in plants and its applications: A Review. *INT J Curr Sci*, 19(4): E 86-101.
- Onishi, N., Sakamoto, Y., Hirose, T., 1994. Synthetic seeds as an application of mass production of somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 39, 137-145.
- Ohashi, K., Wakui, T., Yonai, S., 1992. *In vitro* mass propagation of *Cyclamen persicum* Mill. (3). Propagation from root tissues via somatic embryo. *Bull Tochigi Agric Exp Stn* 39:57–76.
- Otani, M., Shimada, T., 1991. Somatic embryogenesis and plant regeneration from *Cyclamen persicum* Mill. leaf culture. *Plant Tissue Cult Lett* 8:121–123.
- Özcan, S., Babaoğlu, M., Sancak, C., 2001. Somatic embryogenesis, Bitki Biyoteknolojisi I-Doku Kültürü ve Uygulamaları, Selçuk Üniv. s:71-88.

- Özhatay, N., Byfield, A., 2005. Türkiye'nin 122 Önemli Bitki Alanı, Doğal Hayatı Koruma Vakfı 1-24, İstanbul, 476.
- Patel, AV., Pusch, I., Mix-Wagner, G., Vorlop, KD., 2000. A novel encapsulation technique for the production of artificial seeds. *Plant Cell Rep*;19:868–74.
- Petrić, M., Subotić, A., Jevremović, S., Trifunović-Momčilov, M., Tadić, V., Grujić, Ma., Vujčić, Z., 2017. Esterase and peroxidase isoforms during initial stages of somatic embryogenesis in *Fritillaria meleagris* L. leaf base. *Arch Biol Sci.* 69(4):619-625.
- Polat, G., 2016. *Cyclamen coum* subsp. *coum* Mill. Taksonunun bazı anatomik ve ekofizyolojik karakterlerinin farklı yükseltilerdeki fenotipik esnekliğinin karşılaştırılması. Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ordu, 91.
- Pradhan, S., Tiruwa, BL., Subedee, BR., Pant, B., 2016. Efficient plant regeneration of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw., a threatened orchid of nepal through artificial seed technology. *American Journal of Plant Sciences*, 7, 1964-1974.
- Prange, A.N.S, Bartsch, M., Serek, M., Winkelmann, T., 2010a. Regeneration of Different *Cyclamen* Species via Somatic Embryogenesis from Callus, Suspension Cultures and Protoplasts. *Sci Hortic.*, 125, 442–450.
- Prange, A.N.S., Bartsch, M., Meiners, J., Serek, M., Winkelmann, T., 2012. Interspecific Somatic Hybrids Between *Cyclamen persicum* and *C. coum*, Two Sexually Incompatible Species. *Plant cell reports*, 31 (4), 723-735.
- Prange, ANS., Serek, M., Bartsch, M., Winkelmann, T., 2010b. Efficient and stable regeneration from protoplasts of *Cyclamen coum* Miller via somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 101:171–182.
- Prange, ANS., Serek, M., Winkelmann, T., 2008. Vegetative propagation of different *Cyclamen* species via adventitious shoot formation from seedling tissue. *Propag Ornament Plants* 8(4):204–209.

- Ptak A., Bach, A., 2007. Somatic embryogenesis in tulip (*Tulipa gesneriana* L.) flower stem cultures. *In vitro* Cell.Dev.Biol.—Plant 43:35–39.
- Püschel, A.K., Schwenkel, H.G., Winkelmann, T., 2003. Inheritance of the Ability for Regeneration via Somatic Embryogenesis in *Cyclamen persicum* Mill. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 72, 43–51.
- Radoeva, T., and Weijers, D. (2014). A roadmap to embryo identity in plants. *Trends Plant Sci.* 19, 709–716. doi: 10.1016/j.tplants.2014.06.009
- Rai, MK., Asthana, P., Singh, SK., Jaiswal, VS., Jaiswal, U., 2009. The encapsulation technology in fruit plants—a review. *Biotechnol Adv.* 27:671–9.
- Ratjens, S., Mortensen, S., Kumpf, A., Bartsch, M., Winkelmann T., 2018. Embryogenic Callus as Target for Efficient Transformation of *Cyclamen persicum* Enabling Gene Function Studies. *Front. Plant Sci.*, Volume 9, Article 1035.
- Redenbaugh, K., Slade, D., Viss, PR., Fujii, J., 1987. Encapsulation of somatic embryos in synthetic seed coats. *Hort Sci* 22: 803-809.
- Reinert, J., 1958. Untersuchungen über die Morphogenese an Gewebekulturen. *Ber Deutsch Bot Ges* 71:15.
- Rihan, HZ., Kareem, F., El-Mahrouk, ME., Fuller, MP., 2017. Artificial seeds (Principle, Aspects and Applications). *Agronomy*, 7, 71.
- Rode, C., Gallien, S., Heintz, D, Van Dorsselaer, A., Braun, HP., Winkelmann, T., 2011. Enolases: storage compounds in seeds? evidence from a proteomic comparison of zygotic and somatic embryos of *Cyclamen persicum* Mill. *Plant Mol Biol* 75:305–319.
- Rode, C., Lindhorst, K., Braun, HP., Winkelmann, T., 2012. From callus to embryo: a proteomic view on the development and maturation of somatic embryos in *Cyclamen persicum*. *Planta* 235(5):995–1011.

- Rugini, E., 1984. In vitro plant propagation of some olive (*Olea europaea* Sativa L.) cultivars with different root-ability, and medium development using analytical data from developing shoots and embryos. *Scient. Hort.*, 24: 123-134.
- Sage DO., Lynn, J., Hammatt N., 2000. Somatic embryogenesis in *Narcissus pseudonarcissus* cvs. Golden Harvest and St. Keverne. *Plant Science* 150 209–216.
- Saiprasad, GVS., and Polisetty, R., 2003. Propagation of three orchid genera using encapsulated protocorm-like bodies. *In vitro Cell. Dev. Biol.—Plant* 39:42–48.
- Sargın, SA., Selvi S., Akçiçek, E., 2013. Alaşehir (Manisa) ve Çevresinde Yetişen Bazı Geofitlerin Etnobotanik Açından İncelenmesi. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 29(2):170-177.
- Sarijlu EMT., 2016. Türkiye’de doğal yayılış gösteren bazı siklamen (*Cyclamen* spp.) türlerinde kolhisin, oryzalin ve konalt-60 uygulamaları üzerinde araştırmalar. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Adana, 129.
- Savona, M., Ruffoni, B., Giovannini, A., Altamura, M.M., 2007. *Cyclamen persicum* Mill. cv. ‘Halios’: Somatic Embryogenesis and Phenotypic Analysis of Somatic Embryo-Derived Plants. *Acta Hort* 743:91–98.
- Schwenkel, H.G., Winkelmann, T., 1998. Plant Regeneration via Somatic Embryogenesis from Ovules of *Cyclamen persicum* Mill. *Plant Tissue Cult Biotechnol* 4, 28–34.
- Sevindik, B., 2018. Siklamende Anter ve Ovül Kültürü Yöntemleri İle Haploid Bitkilerin Elde Edilmesi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Adana, 175.
- Seyidoğlu, N., 2009. Bazı Doğal Geofitlerin Peyzaj Düzenlemelerinde Kullanımı ve Üretimi Üzerine Araştırmalar, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

- Seyring, M., and Hohe, A., 2005. Induction of desiccation-tolerance in somatic embryos of *Cyclamen persicum* Mill. Journal of Horticultural Science & Biotechnology, 80 (1) 65–69.
- Seyring, M., Ewald, A., Muller, A., Haensch, K.T., 2009. Screening for Propagation Suitability *In vitro* of different Cyclamen species. Electron J. Biotechnol., 12, 4–7.
- Sharma, S., Shahzad, A., Da Silva, JAT., 2013. Synseed technology—A complete synthesis. Biotechnology Advances, 31 186-207.
- Shen, H.J., J.T. Chen, H.H. Chung, and W.C. Chang. 2018. Plant regeneration via direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Tolumnia* Louise Elmore ‘Elsa’. Bot. Stud. 59:4.
- Shinoyama, H., Nomura Y., Tsuchiya T., and Kazuma T., 2004. A Simple and Efficient Method for Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Leaves of Chrysanthemum [*Dendranthema X grandiflorum* (Ramat.) Kitamura]. Plant Biotechnology, 21 (1), 25–33.
- Simões, C., Albarello, N., Callado, CH., Castro, TC., and Mansur, E., 2010. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Callus Cultures of *Cleome rosea* Vahl. Braz. Arch. Biol. Technol. v.53 n.3: pp. 679-686.
- Smertenko, A., and Bozhkov, PV., 2014. Somatic embryogenesis: life and death processes during apical–basal patterning. Journal of Experimental Botany, Vol. 65, No. 5, pp. 1343–1360.
- Stella, YR., Priya, TA., Begam, KMF., Manimekalai, V., 2015. *In vitro* seed germination, somatic embryogenesis and protocorm based micro propagation of a terrestrial ornamental orchid - *Spathoglottis plicata* blume. European Journal of Biotechnology and Bioscience 3, 4, 20-23.
- Steward, FC., Mapes, MO., Smith, J., 1958. Growth and organized development of cultured cells. I. Growth and division of freely suspended cells. Am J Bot 45:693-703.

- Taha, MT., Mahmad, N., Yaacob, JS., Abdullah, N., Mohajer, S., 2013. Synthetic seeds production and regeneration of *Oxalis triangularis* for mass propagation and conservation. International Journal of Environmental Science and Development, Vol. 4, No. 5.
- Takamura, T., Miyajima, I., Matsuo, E., 1995. Somatic embryogenesis of *Cyclamen persicum* mill Anneke from Aseptic Seedlings. Plant Cell Reports. 15(1-2): 22-25.
- Takamura, T., Sakamoto, K., Horikawa, M., 2011. Effect of Carbon Source on *in vitro* Plant Regeneration in Anther Culture of Cyclamen (*Cyclamen persicum* Mill.). In XXVIII International Horticultural Congress on Science and Horticulture for People (IHC2010): International Symposium on Micro 923, 129-134.
- Tanaka, K., Kanno, Y., Kudo S., Suzuki M., 2000. Somatic embryogenesis and plant regeneration in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura). Plant Cell Reports 19:946–953.
- Tanker, N., Türköz, S., 1984. *Cyclamen cilicicum* Boiss. Et Heldr var. *intaminatum* Meikle Üzerinde Morfolojik ve Anatomik Araştırmalar, Gazi Ecz. Fak. Der., 1(2):79.
- Temiz, MG., 2009. Nar (*Punica granatum*)’da farklı büyüme düzenleyicilerinin ve farklı eksplant kaynaklarının somatik embriyogenesis üzerine etkileri. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Adana, 39.
- Terakawa, T., Yamamura, T., Murayama, T., 2008. Improvement of regeneration and transformation systems for *Cyclamen persicum* using somatic embryo culture. Plant Biotechnol (Japan) 25:77–80.
- Tomiczak, K., Mikula, A., Sliwinska, E., Rybczyński, JJ., 2015. Autotetraploid plant regeneration by indirect somatic embryogenesis from leaf mesophyll protoplasts of diploid *Gentiana decumbens* Lf. *In vitro* Cell Dev Biol Plant 51:350–359.

- Wicart, G., Mouras, A., Lutz, A., 1984. Histological study of organogenesis and embryogenesis in *Cyclamen persicum* Mill. Tissue culture: evidence for a single organogenesis pattern. *Protoplasma* 119:159–167.
- Winkelmann, T., 2010. Clonal Propagation of *Cyclamen persicum* via Somatic Embryogenesis. (Editörler: Jain, S.M., Ochatt, S.J.), *Protocols for in vitro propagation of ornamental plants, methods in molecular biology*. Humana press, New York City, 81–90.
- Winkelmann, T., Hohe, A., Schwenkel, HG., 1998b. Establishing embryogenic suspension cultures in *Cyclamen persicum* ‘Purple Flamed’. *Adv Hort Sci* 12(1):25–30.
- Winkelmann, T., Meyer, L., Serek, M., 2003. Maturation and desiccation of somatic embryos of *Cyclamen persicum*. *Acta Hort* 612:27–34.
- Winkelmann, T., Meyer, L., Serek, M., 2004. Germination of encapsulated somatic embryos of *Cyclamen persicum*. *Hortscience* 39(5):1093–1097.
- Winkelmann, T., Mussmann, V., Serek, M., 2004. Cryopreservation of embryogenic suspension cultures of *Cyclamen persicum* Mill. *Plant Cell Rep* 23:1–8.
- Winkelmann, T., Ratjens, S., Bartsch, M., Rode, C., Niehaus, K., Bednarz, H., 2015. Metabolite Profiling of Somatic Embryos of *Cyclamen persicum* in Comparison to Zygotic Embryos, Endosperm, and Testa. *Frontiers in plant science*, 6.
- Winkelmann, T., Sangwan, RS., Schwenkel, HG., 1998a. Flow cytometric analyses in embryogenic and non-embryogenic callus lines of *Cyclamen persicum* Mill.: relation between ploidy level and competence for somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep* 17(5):400–404.
- Winkelmann, T., Serek, M., 2005. Genotypic Differences in Callus Formation and Regeneration of Somatic Embryos in *Cyclamen persicum* Mill. *Euphytica*, 144, 109–116.

- Winkelmann, T., Specht, J., Serek, M., 2006. Efficient Plant Regeneration from Protoplasts Isolated from Embryogenic Suspension Cultures of *Cyclamen persicum* Mill. Plant Cell Tissue Organ Cult., 86, 337–347.
- Yaacob JS., Yussof, AIM., Taha RM., and Mohajer, S., 2012. Somatic embryogenesis and plant regeneration from bulb, leaf and root explants of African blue lily (*Agapanthus praecox* ssp. minimus). AJCS 6(10):1462-1470.
- Yalçın Mendi, N.Y., Çürük, P., 2016. Türkiye Florası Siklamenleri. Adana, 96.
- You, CR., Fan, TJ., Gong, XQ., Bian, FH., Liang, LK., Qu, FN., 2011. A high-frequency cyclic secondary somatic embryogenesis system for *Cyclamen persicum* Mill. Plant Cell Tissue Organ Cult 107:233–242.
- You, CR., Fan, TJ., Qu, FN., Bian, FH., Liang, LK., Gong, XQ., 2008. Somatic embryogenesis and study on histology and cytology in *Cyclamen persicum* Mill. J Sichuan Univ (Nat Sci Ed) 6:044.
- Yücesan, BB., Çiçek, F., Gürel, E., 2014. Somatic embryogenesis and encapsulation of immature bulblets of an ornamental species, Grape hyacinths (*Muscari armeniacum* Leichtlin ex Baker). Turk J Agric For 38: 716-722.
- Zimmerman, JL., 1993. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. Plant Cell 5:1411-1423.
- Zulkarnain, Z., Tapingkae, T., Taji, A., 2015. Applications of *in vitro* techniques in plant breeding. In: Al-Khayri JM, Jain SM, Johnson (ed) Advances in Plant Breeding Strategies: Breeding, Biotechnology and Molecular Tools, vol 1. Springer, Switzerland, p 293-328.
- www.cyclamen.org 20.07.2019.
- www.wikipedia.org 20.07.2019.

ÖZGEÇMİŞ

Mersin/Tarsus'ta 1987 yılında doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Tarsus'ta tamamladı. Üniversite öğrenimine 2009 yılında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri bölümünde tamamladı. Yüksek lisans öğrenimini Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Bölümünde tamamladı.

